

HELENA ISABEL FARINHA DE OLIVEIRA

**TECNOLOGIA DE *iPLEX MASSARRAY* APLICADO AO
DIAGNÓSTICO DE MIOCARDIOPATIA
HIPERTRÓFICA**

Dissertação apresentada para a obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia Biotecnológica no
Curso de Mestrado em Engenharia Biotecnológica
conferido pela Universidade Lusófona de
Humanidades e Tecnologias

Orientadora: Professora Doutora Maria
Alexandra Nuncio de Carvalho Ramos Fernandes

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais

Lisboa

2012

Parte do trabalho apresentado nesta dissertação encontra-se incluída no artigo:

Santos, S., Lança, V., Oliveira, H., Branco, P., Silveira, L., Marques, V., Brito, D., Madeira, H., Bicho, M. e Fernandes, A.F. 2011. *Genetic Diagnosis of Hypertrophic Cardiomyopathy using Mass Spectrometry DNA Arrays and High Resolution Melting*. Revista Portuguesa de Cardiologia, 30 (01), 7-18.

Publicações adicionais:

Santos, S., Marques, V., Pires, M., Silveira, L., Oliveira, H., Lança, V., Brito, D., Madeira, H., Carreira, I.M., Gaspar, I.M., Monteiro, C., Fernandes, A.R.. 2012. *High resolution melting: improvements in the genetic diagnosis of Hypertrophic Cardiomyopathy in a Portuguese cohort*. BMC Medical Genetics, 13-17.

Marques V., Pires, M., Santos S., Oliveira, H., Monteiro, C, Fernandes A.R.. *Novel Sarcomeric Mutations Associated to Hypertrophic Cardiomyopathy in a Portuguese cohort*. 15ª Reunião Anual. Sociedade Portuguesa de Genética Humana. Parque das Nações, Lisboa, Portugal. 10-12 November 2011, 58 (comunicação oral).

Araújo, R., Santos, S., Lança, V., Oliveira, H., Marques, V., Branco, P., Silveira, L., Brito, D., Madeira, H., Fernandes, A.R.. *High resolution melting analysis can extend the diagnostic power in HCM patients*. 13ª Reunião da Sociedade Portuguesa de Genética Humana, Casa do Médico, Porto, 19-21 Novembro, 2009.

Lança, V., Oliveira, H., Brito D., Madeira H., Bicho M. P., Fernandes, A. R.. *Genetic diagnostic of hypertrophic cardiomyopathy using mass spectrometry arrays and high resolution melting*. European Conference of Human Genetics, Vienna, 23-26 May 2009.

Lança, V., Oliveira, H., Brito D., Madeira H., Bicho M. P., Fernandes, A. R. *Acoplamento de genotipagem por espectrometria de massa e desnaturação de alta resolução*

na caracterização genética da miocardiopatia hipertrófica. XXXIV Jornadas Portuguesas de Genética, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, 27 Abril 2009.

Lança, V., Oliveira, H., Brito D., Madeira H., Bicho M. P., Fernandes, A. R..
Potencial de uma nova técnica na caracterização genética da miocardiopatia hipertrófica. XXX Congresso Português de Cardiologia. TIVOLI MARINOTEL - Vilamoura, 19 a 22 de Abril de 2009.

Dedicatória

A todas as pessoas que estão presentes na minha vida!

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço ao Laboratório de Investigação da Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais (FECN) da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias por ter acolhido a realização da minha tese de mestrado.

O meu Muito Obrigada à Professora Doutora Alexandra Fernandes que permitiu que entrasse neste mundo da Investigação, por tudo o que me ensinou, aconselhou, fazendo de mim uma pessoa melhor. O meu Muito Obrigada à Professora Doutora Susana Santos que ao acompanhar todo o meu percurso, foi muito importante na minha educação, por tudo o que me deu a conhecer, permitindo-me dar mais um passo na minha vida. O meu Muito, mas Muito Obrigada às minhas duas Orientadoras de Mestrado e não só, da vida!

O meu Muito Obrigada a todos os meus colegas e amigos (as) que conheci, ganhei e pude acompanhar em mais uma fase das nossas vidas, por todas as ideias trocadas, opiniões, dicas, brincadeiras, risadas e companheirismo. Patrícia Branco, João Leite, Luís Raposo, Vanda Marques, Ana Silva, Kelly Veiga, Leonor Silveira, Ana Sousa, Daniel Luís, Marina Pires, Ana Cláudia Nunes, Joana Silva e Sónia Silva, acreditem que vão ter sempre um lugar na minha vida e no meu coração por todos os momentos que partilhámos!

Às minhas queridas colegas e amigas, Vanessa Santos e Teresa Veríssimo o meu Muito Obrigada, por tudo o que aprendemos, trabalhamos e partilhámos juntas ao longo do mestrado. Vocês vão sempre fazer parte da minha vida!

Como não podia deixar de referir, o meu Muito Obrigada à minha amiga Mariana Mastbaum que conheço desde os meus primeiros passos na faculdade e que se tornou das pessoas mais importantes na minha vida académica, por tudo o que me ensinou e partilhámos juntas ao longo do curso e sobretudo da amizade que compartilhamos!

Aos amigos Zé Cruz, Cristina, Teresa e Henrique, Susana e Pedro Diener o meu Muito Obrigada por todos os momentos juntos, mergulhos, regatas ou simplesmente uma velejada pelo rio e sobretudo pela amizade! Vocês vão sempre ser especiais e estar no meu coração!

Aos meus grandes companheiros e amigos João França e João Barrier por todos os momentos divertidos que passámos nas aulas de Patrão de Costa e agora nas de Patrão de Alto Mar, a rir, a não conseguir parar de rir, à procura de uma simples estrela ou simplesmente a perdermos a estrela de vista! O meu Muito Obrigada pela vossa amizade e companheirismo!

Ao meu amiguinho querido do coração Ricardo Matias, o meu Muito Obrigada por todos os momentos de amizade, de brincadeira risadas e também pelas horas de estudo, desde que nos conhecemos até agora e sobretudo pela amizade que construímos.

Ao meu querido e grande amigo Miguel Cruz, um Muito Obrigada, por todos os mergulhos, velejadas, jogos em que o meu clube ganhou a teu, brincadeiras e risadas, por toda a amizade e companheirismo que temos!

Ao meu grande amigo Rui Marques, Agradeço imenso a nossa amizade e por todos os momentos de brincadeira, diversão, risadas, estudo e companheirismo, mas sobretudo por todos os momentos de verdadeira amizade!

À minha grande e querida amiguinha Patrícia Silva, que esteve presente em todos os momentos importantes da minha vida, desde o primeiro dia de praxes até aos dias de hoje. O meu Muito Obrigada por tudo o que partilhámos, desde aquele relatório escrito à mão a todas as risadas e brincadeiras, mas sobretudo pelas palavras amigas e pela grande amizade que construímos!

À minha querida Avó por toda a amizade, carinho e pelas palavras de encorajamento ao longo da minha vida!

Por fim, não podia deixar de Agradecer e Muito aos meus Pais, por tudo o que me ensinaram, trabalharam por mim, me proporcionaram, tornando-me a pessoa que sou hoje. Um Muito Obrigada por tudo!

Obrigada a todos que me fazem sorrir!

Resumo

A miocardiopatia hipertrófica (MH) é a doença cardíaca genética mais comum, afectando 1:500 indivíduos, apresentando um padrão de transmissão autossómico dominante, com mutações associadas a genes sarcoméricos e não sarcoméricos.

A MH apresenta uma variedade de manifestações clínicas, desde indivíduos assintomáticos a indivíduos que manifestam uma progressão da severidade dos sintomas, podendo nalguns casos ocorrer morte súbita.

O diagnóstico clínico é realizado por Electrocardiograma e Ecocardiograma. O diagnóstico genético baseia-se na Sequenciação Automática (SA) dos 5 principais genes sarcoméricos *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* e *MYL2*, sendo considerada uma metodologia bastante dispendiosa e demorada e que não permite a identificação de mutações em cerca de 1/3 dos indivíduos.

A Genotipagem por *iPLEX MassARRAY* revela-se uma boa alternativa à SA no diagnóstico genético de MH, uma vez que permite a análise de várias amostras em simultâneo, para um elevado número de mutações, num único ensaio, com uma maior rentabilidade de tempo e recursos.

Este trabalho teve como objectivo a optimização e a validação desta metodologia, na detecção de 541 mutações em 33 genes, tendo-se verificado que 29 % das reacções *multiplex* necessitam de ser revistas, quer pelo desenho de novos conjuntos de *primers*, quer pela sua realocação no *chip*.

Palavras-chave: Miocardiopatia Hipertrófica, Mutações, Genotipagem, *iPLEX MassARRAY*, Diagnóstico

Abstract

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most common genetic heart disease, affecting 1:500 individuals, with an autosomal dominant pattern of inheritance, with mutations associated with sarcomeric and non-sarcomeric genes.

HCM presents a variety of clinical manifestations, from asymptomatic individuals to individuals who show a progression of severity symptoms and in some cases sudden death.

The clinical diagnosis is made by Electrocardiogram and echocardiogram. The genetic diagnosis is based on the automatic sequencing of the 5 main sarcomeric genes *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* e *MYL2*. This method is considered very expensive and time consuming and doesn't allow the identification of mutations in about one third of the individuals.

The *iPLEX MassARRAY* genotyping turns out to be a good alternative to the automatic sequencing in genetic diagnosis of HCM, since it allows the analysis of multiple samples simultaneously, for a large number of mutations in a single assay, with reduction of time and costs.

This work aimed the optimization and validation of this methodology in the detection of 541 mutations in 33 genes which has found that 29 % of *multiplex* reactions have to be amended, by designing new sets of primers and their relocation in chip.

Key-words: Hypertrophic Cardiomyopathy, Mutations, Genotyping, *iPLEX MassARRAY*, Diagnosis

Zusammenfassung

Die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist die häufigste genetische Erkrankung. Sie betrifft 1:500 Individuen und zeigt eine autosomal-dominante Vererbung mit Mutationen an sarkomerischen und nicht-sarkomerischen Genen.

Die Klinik der HCM ist vielfältig. Sie kann asymptomatisch sein oder sich progressiv verschlechtern. In manchen Fällen endet sie in plötzlichem Herztod.

Die klinische Diagnose wird mithilfe eines Elektrokardiogramms und einer Echokardiographie gestellt. Bei der genetischen Diagnose führt man eine Automatische Sequenzierung (AS) der 5 sarkomerischen Hauptgene *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* und *MYL2* durch. Diese Methode wird als sehr teuer und zeitraubend angesehen und führt in 1/3 der Fälle nicht zu der Identifikation von Mutationen.

Als gute Alternative zur Diagnostik der HCM kommt die Genotypisierung durch *iPLEX MassARRAY* in Frage. Diese erlaubt die simultane Analyse von zahlreichen Mutationen bei multiplen Proben in einem einzigen Durchgang. Dadurch spart man Zeit und Ressourcen ein.

Diese Arbeit hatte als Ziel die Optimierung und Validierung letzterer Methode, indem man 541 Mutationen in 33 Genen detektierte. Es zeigte sich, dass bei 29 % der *multiplex* Reaktionen eine Verbesserung notwendig ist. Hierbei wären neue Primer erforderlich und man müsste eine Relokalisierung auf dem Chip vornehmen.

Schlüsselwörter: Hypertrophe Kardiomyopathie, Mutationen, Genotypisierung, *iPLEX MassARRAY*, Diagnostik

Lista de Abreviaturas

A	adenina
ACE	gene que codifica para a enzima conversora de angiotensina-1
ACTC1	gene que codifica para a proteína actina cardíaca
ACTN2	gene que codifica para a proteína α -actinina
ADP	adenosina difosfato
Ala	alanina
AMP	adenosina monofostato
AMPK	subunidade γ_2 regulatória da AMP cinase
ANKRD1	gene que codifica para a proteína do domínio 1 da repetição da anquirina
Arg	arginina
Asn	asparagina
Asp	aspartato
ATP	adenosina trifosfato
C	citossina
Ca ²⁺	íon cálcio
CASQ2	gene que codifica para a proteína calsequestrina 2
CAV3	gene que codifica para a proteína caveolina 3
COX15	gene que codifica para a proteína associada à montagem da estrutura do citocromo C oxidase
CS-1	gene que codifica para a proteína cal sarcina -1
CTnC	isoforma expressa no músculo cardíaco
Cys	cisteína
CSR3	gene que codifica para a proteína LIM do músculo cardíaco
CRP	proteínas ricas em cisteína
DES	gene que codifica para a proteína desmina
dHPLC	Cromatografia líquida de alta desnaturação, do inglês: <i>Denaturing high-performance liquid chromatography</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
dsDNA	cadeia dupla do ácido desoxirribonucleico
dNDPs	desoxirribonucleotídeos monofosfatados

dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DO	densidade óptica
<i>DYS</i>	gene que codifica para a proteína distrofina
ECG	electrocardiograma
EEG	ecocardiograma bidimensional
<i>FXN</i>	gene que codifica para a proteína frataxina
FTnC	isoforma <i>fast</i> expressa no músculo-esquelético
G	guanina
GAA	ácido α -1,4-glucosidade
GLA	gene que codifica para a proteína α -galactosidase hidrolase lisossomal
Gln	glutamina
Glu	glutamato
Gly	glicina
His	histidina
HRM	desnaturação de alta resolução, do inglês: <i>high resolution melting</i>
HVE	hipertrofia do ventrículo esquerdo
Ile	isoleucina
<i>JPH2</i>	gene que codifica para a proteína junctofilina 2
K ⁺	ião potássio
<i>LAMP2</i>	gene que codifica para a proteína membrana associada ao lisossoma
Leu	leucina
Lys	lisina
MALDI	Matriz sujeita a laser de dessorção/ionização, do inglês: <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MALDI-TOF	Matriz sujeita a laser de dessorção/ionização - tempo de voo do, do inglês: <i>matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight</i>
MD	miocardiopatia dilatada
Met	metionina
Mg ²⁺	ião magnésio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MH	miocardiopatia hipertrófica
Miosina ATPase	adenosina trifosfato miosina
<i>MLP</i>	proteína LIM do músculo cardíaco

MR	miocardiopatia restritiva
<i>MYBPC3</i>	gene que codifica para a proteína C de ligação à miosina cardíaca
<i>MYH6</i>	gene que codifica para a proteína cadeia pesada α da miosina
<i>MYH7</i>	gene que codifica para a proteína cadeia pesada β da miosina
<i>MYL2</i>	gene que codifica para a cadeia leve regulatória da miosina cardíaca
<i>MYL3</i>	gene que codifica para a cadeia leve essencial da miosina cardíaca
<i>MYLK2</i>	gene que codifica para a proteína cinase 2 da cadeia leve da miosina no músculo-esquelético
<i>MYO6</i>	gene que codifica para a proteína miosina 6
Na ⁺	ião sódio
<i>OBSCN</i>	gene que codifica para a proteína obscurina
P _i	fosfato inorgânico
PCR	reação em cadeia de polimerase, do inglês: <i>Polymerase chain reaction</i>
<i>PLN</i>	gene que codifica para a proteína <i>fosfolamban</i>
<i>PKC</i>	proteína cinase C
<i>PRKAG2</i>	gene que codifica para a subunidade γ_2 regulatória da proteína AMP cinase
<i>PRKAG2a</i>	isoforma do transcrito curto da subunidade γ_2 regulatória da proteína AMP cinase
<i>PRKAG2b</i>	isoforma do transcrito longo da subunidade γ_2 regulatória da proteína AMP cinase
Pro	prolina
RMC	ressonância magnética cardíaca
RNA	ácido ribonucleico
SA	sequenciação automática
SAP	fosfatase alcalina de camarão, do inglês: <i>shrimp alkaline phosphatas</i>
<i>SCL25A4</i>	gene que codifica para o transportador mitocondrial, translocador de adenina, família 25, membro 4
SNP	polimorfismo de um único nucleótido, do inglês: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNR	ruído de fundo, do inglês <i>signal to noise</i>

SSCP	polimorfismo de cadeia simples, do inglês: <i>single strand conformation polymorphism</i>
STnC	isoforma <i>slow</i> expressa no músculo-esquelético
T	timina
TCAP	gene que codifica para a proteína teletonina
TOF	tempo de voo, do inglês: <i>time of flight</i>
TPM1	gene que codifica para a proteína α -tropomiosina cardíaca
TNNC1/TnC	gene que codifica para a proteína troponina C cardíaca (TnC)
TNNI3/TnI	gene que codifica para a proteína troponina I cardíaca (TnI)
TNNT2/TnT	gene que codifica para a proteína troponina T cardíaca (TnT)
TTN	gene que codifica para a proteína titina
Trp	triptofano
TTN	gene que codifica para a proteína telotonina
Tyr	tirosina
UV	ultravioleta
Val	valina
VCL	gene que codifica para a proteína vinculina

Lista de Unidades

°C	Graus Celsius
°	Graus
% p/v	Percentagem peso/volume
KDa	Quilodalton; Da – Dalton (10^{-3} Da)
Kg	Quilogramas; g - gramas (10^{-3} Kg); μ g – micrograma (10^{-6} Kg); ng – nanograma (10^{-9} Kg)
L	Litro; mL - mililitro (10^{-3} L); μ L - microlitro (10^{-6} L)
M	Molar (mol/L); mM - milimolar (10^{-3} M); μ M - micromolar (10^{-6} M); nM – nanomolar (10^{-9} M)
m	Metro; mm - milímetro (10^{-3} m); μ m – micrómetro (10^{-6} m); nm – nanómetro (10^{-9} m)
mol	Mole
pb	Pares de base
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos; μ s – microsegundos (10^{-3} s)
V	Voltes

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Miocardiopatias	1
1.2.	Miocardiopatia hipertrófica	2
1.2.1.	Caracterização da doença	2
1.2.2.	Epidemiologia.....	2
1.2.3.	Sintomatologia.....	3
1.2.4.	Histopatologia.....	3
1.2.5.	Penetrância.....	5
1.3.	Músculo Cardíaco	5
1.3.1.	Fisiologia celular dos cardiomiócitos	5
1.3.2.	Sarcómero Cardíaco.....	6
1.3.3.	Contração muscular cardíaca	7
1.4.	Genética Molecular da miocardiopatia hipertrófica	9
1.5.	Proteínas do Sarcómero Cardíaco.....	10
1.5.1.	Proteína C de ligação à miosina cardíaca	11
1.5.2.	Miosina Cardíaca	11
1.5.2.1.	Cadeia pesada β da miosina cardíaca	12
1.5.2.2.	Cadeia pesada α da miosina cardíaca	14
1.5.2.3.	Cadeia leve regulatória e cadeia leve essencial da miosina cardíaca.....	14
1.5.3.	Actina cardíaca	15
1.5.4.	Complexo das troponinas	16
1.5.4.1.	Troponina C cardíaca	17
1.5.4.2.	Troponina I cardíaca.....	18
1.5.4.3.	Troponina T cardíaca	19
1.5.5.	α -Tropomiosina	19

1.6.	Proteínas do Disco Z.....	21
1.6.1.	Titina.....	22
1.6.2.	Proteína LIM do músculo cardíaco.....	23
1.6.3.	Teletonina	23
1.7.	Proteínas envolvidas nas fenocópias de MH	24
1.7.1.	Subunidade $\gamma 2$ regulatória da proteína AMP cinase.....	25
1.7.2.	Proteína membrana associada ao lisossoma.....	26
1.8.	Mutações associadas à miocardiopatia hipertrófica: seu impacto no estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo	27
2.	Diagnóstico clínico de MH.....	29
2.1.	Diagnóstico Molecular na MH	30
3.	Tecnologia de <i>iPLEX MassARRAY</i>	33
3.1.	Fundamento	33
3.2.	Desenho de <i>primers</i> de <i>iPLEX MassARRAY</i>	35
3.3.	Análise dos resultados de genotipagem.....	38
4.	Objectivo do Trabalho	42
5.	Materiais e Métodos	43
5.1.	Extracção e Quantificação do DNA	43
5.3.	Amplificação de regiões específicas do DNA	45
5.3.1.	Desenho dos <i>primers</i> e das placas	45
5.3.2.	Preparação da mistura de reacção de amplificação	46
5.4.	Tratamento pela enzima <i>shrimp alkaline phosphatase</i>	47
5.4.1.	Incubação da Solução Enzimática SAP.....	48
5.5.	Reacção de <i>iPLEXGold</i>	49
5.5.1.	Ajuste da Extensão dos <i>primers</i>	49
5.5.2.	Preparação da mistura de reacção.....	49
5.5.3.	Amplificação das reacções de extensão.....	51

5.6.	Limpeza dos produtos de reacção	51
5.6.1.	Preparação da placa de resina	51
5.6.2.	Adição de água à microplaca	52
5.6.3.	Adição de resina às amostras da placa de 384 poços.....	52
5.7.	Dispensa no <i>SpectroCHIP</i> e Espectrometria de massa MALDI-TOF.....	53
6.	Resultados e Discussão	54
6.1.	Análise da integridade das amostras	55
6.2.	Etapas de Optimização	57
6.2.1.	<i>AutoCluster</i> e <i>Traffic Light Pane</i>	57
6.2.3.	Ensaio 1	60
6.2.4	Ensaio 2	98
6.2.5	Ensaio 3	129
7.	Conclusão e Perspectivas Futuras.....	175
8.	Bibliografia	179
9.	Anexos	i

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Genes que codificam para as proteínas sarcoméricas e não sarcoméricas e respectivas mutações associadas à MH	9
Tabela 3.1 - Exemplo de sequência utilizada pelo <i>software MASSARRAY Assay Design 3.1</i> . (<i>Sequenom</i> [®]) para o desenho dos <i>primers</i> de amplificação e de extensão para a mutação CM56 no gene <i>MYBPC3</i>	35
Tabela 5.1 – Mistura de reacção do PCR para 384 reacções	47
Tabela 5.2 – Condições de reacção de amplificação de DNA por PCR	47
Tabela 5.3 – Composição da solução enzimática SAP	48
Tabela 5.4 – Condições de reacção de amplificação da mistura de reacção SAP	49
Tabela 5.5 – Composição da mistura de reacção de <i>iPLEXGold</i>	50
Tabela 5.6 – Condições de reacção de amplificação do <i>iPLEXGold</i>	51
Tabela 6.1 – Tabela indicativa do número de mutações testadas por gene no <i>chip</i> em estudo associado à MH por tecnologia de <i>iPLEX MassARRAY</i>	54
Tabela 6.2 – Concentração e pureza do DNA extraído a partir de 126 amostras de sangue periférico de doentes com MH	56
Tabela 6.3 - Resultados do Ensaio 1, com base nos parâmetros: valor do SNR, valor de extensão e genótipo atribuído a cada uma das mutações alocadas para outro <i>plex</i>	96
Tabela 6.4 – Lista dos conjuntos de <i>primers</i> removidos após análise do Ensaio 1, constituído por 21 <i>plexes</i> para o Ensaio 2, constituído por 31 <i>plexes</i>	99
Tabela 6.5 – Lista de mutações que foram retiradas dos 21 <i>plexes</i> do Ensaio 1, mas que não foram reintroduzidas nos <i>plexes</i> 22 a 31 no Ensaio 2	128
Tabela 6.6 – Lista dos conjuntos de <i>primers</i> removidos após análise do Ensaio 2, constituído por 31 <i>plexes</i> para o Ensaio 2, constituído por 35 <i>plexes</i>	130

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Diferenças morfológicas entre um coração com miocardiopatia hipertrófica (Figura 1.1A), um coração saudável (Figura 1.1B) e um coração com miocardiopatia dilatada (Figura 1.1C)	1
Figura 1.2 – Características histológicas do miocárdio cardíaco com MH	4
Figura 1.3 - Constituição do músculo cardíaco	5
Figura 1.4 – Constituintes principais do sarcómero cardíaco	6
Figura 1.5 - Esquema representativo do sarcómero cardíaco	7
Figura 1.6 – Ciclo da contracção cardíaca	8
Figura 1.7 – Miofilamentos grossos cardíacos, salientando-se a estrutura da miosina II	12
Figura 1.8 – Estrutura molecular da cadeia pesada da miosina cardíaca e localização de mutações associadas a MH.....	13
Figura 1.9 – Complexo das Troponinas	17
Figura 1.10 – Ligação da α -tropomiosina ao complexo actina – miosina	20
Figura 1.11 – Esquema representativo das proteínas do disco Z	21
Figura 1.12 – Esquema representativo da estrutura do sarcómero cardíaco com a localização da titina, α -actinina e miomesina evidenciadas	22
Figura 1.13 – Remodelação histológica da Miocardiopatia Hipertrófica	24
Figura 3.1 – Reacção de <i>iPLEXMassARRAY</i>	34
Figura 3.2 – <i>Spectrochip</i>	36
Figura 3.3 – Método de ajuste dos <i>primers</i> de extensão, opção 1	37
Figura 3.4 – Método de ajuste dos <i>primers</i> de extensão, opção 2	37
Figura 3.5 – Comparação da concentração não ajustada dos <i>primers</i> não ajustada com a concentração ajustada dos <i>primers</i> pelo Método de Regressão, opção 3	38
Figura 3.6 – Resultados de genotipagem	39
Figura 3.7 – Exemplo de resultados de genotipagem antes e depois do <i>Autocluster</i>	39
Figura 3.8 – Modelo base de genotipagem	40
Figura 5.1 – Organização da placa de <i>iPLEX MassARRAY</i> com 31 <i>Plexes</i>	46

Figura 5.2 – Diagrama representativo do espaço de trabalho	48
Figura 5.3 – Diagrama representativo do espaço de trabalho	50
Figura 5.4 – Placa <i>dimple</i> de 384 poços	51
Figura 5.5 – Diagrama representativo do espaço de trabalho	52
Figura 5.6 – Montagem da placa de 384 poços e da placa <i>dimple</i>	52
Figura 5.7 – Rotação a 360° da microplaca de 384 poços	53
Figura 6.1 – Representação dos resultados originados pelo <i>software Traffic Light Pane</i>	58
Figura 6.2 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM371 no gene <i>TNNT2</i>	59
Figura 6.3 – Organização da placa de <i>iPLEXMassARRAY</i> com 21 <i>Plexes</i> no Ensaio	60
Figura 6.4 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 1 da placa 1 e 2 do Ensaio 1.....	61
Figura 6.5 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM18 no gene <i>MYBPC3</i>	63
Figura 6.6 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 2 da placa 1 e 2 do Ensaio 1.....	63
Figura 6.7 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CI3 no gene <i>MYBPC3</i>	64
Figura 6.8 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 3 da placa 1 e 2 do Ensaio.....	65
Figura 6.9 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CS10 no gene <i>MYBPC3</i>	66
Figura 6.10 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 4 da placa 1 e 2 do Ensaio	67
Figura 6.11 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CD11 no gene <i>MYBPC3</i>	68
Figura 6.12 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 5 da placa 1 e 2 do Ensaio 1.....	69
Figura 6.13 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM108 no gene <i>MYBPC3</i>	70
Figura 6.14 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 6 da placa 1 e 2 do Ensaio 1...	70

Figura 6.15 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM157 no gene <i>PRKAG2</i>	72
Figura 6.16 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 7 da placa 1 e 2 do Ensaio 1....	72
Figura 6.17 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM175 no gene <i>MYH7</i>	73
Figura 6.18 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 8 da placa 1 e 2 do Ensaio 1.....	74
Figura 6.19 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM204 no gene <i>MYBPC3</i>	75
Figura 6.20 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 9 da placa 1 e 2 do Ensaio 1.....	76
Figura 6.21 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM240 no gene <i>JPH2</i>	77
Figura 6.22 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 10 da placa 1 e 2 do Ensaio 1....	78
Figura 6.23 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CS29 no gene <i>MYBPC3</i>	78
Figura 6.24 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 11 da placa 1 e 2 do Ensaio 1...79	
Figura 6.25 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM242 no gene <i>TNNI3</i>	80
Figura 6.26 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 12 da placa 1 e 2 do Ensaio 1...81	
Figura 6.27 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM242 no gene <i>TNNI3</i>	82
Figura 6.28 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 13 da placa 1 e 2 do Ensaio 1....83	
Figura 6.29 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM302 no gene <i>MYH7</i>	84
Figura 6.30 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 14 da placa 1 e 2 do Ensaio 1....	84
Figura 6.31 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM324 no gene <i>JPH2</i>	85
Figura 6.32 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 15 da placa 1 e 2 do Ensaio 1....	86

Figura 6.33 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM354 no gene <i>FXN</i>	86
Figura 6.34 - Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 16 da placa 1 e 2 do Ensaio 1....	87
Figura 6.35 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CP3 no gene <i>MYH7</i>	88
Figura 6.36 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 17 da placa 1 e 2 do Ensaio 1....	89
Figura 6.37 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM367 no gene <i>TCAP</i>	90
Figura 6.38 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 18 da placa 1 e 2 do Ensaio 1....	90
Figura 6.39 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM378 no gene <i>MYLK2</i>	91
Figura 6.40 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 19 da placa 1 e 2 do Ensaio 1....	92
Figura 6.41 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM389 no gene <i>SLC25A4</i>	93
Figura 6.42 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 20 da placa 1 e 2 do Ensaio 1.....	93
Figura 6.43 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM391A no gene <i>TNNT2</i>	94
Figura 6.44 – Gráfico gerado pela ferramenta <i>Call Cluster Plot</i> para o conjunto de <i>primers</i> para a detecção da mutação CM391A no gene <i>TNNT2</i>	95
Figura 6.45 – Organização da placa de <i>iPLEX MassARRAY</i> com 31 <i>plexes</i> no Ensaio 2.....	100
Figura 6.46 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 1 da Placa 5 do Ensaio 2.....	101
Figura 6.47 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 2 da Placa 6 do Ensaio 2.....	102
Figura 6.48 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 3 da Placa 5 do Ensaio 2.....	103
Figura 6.49 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 4 da Placa 5 do Ensaio 2.....	104
Figura 6.50 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 5 da Placa 10 do Ensaio 2.....	105
Figura 6.51 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 6 da Placa 5 do Ensaio 2.....	106
Figura 6.52 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 7 da Placa 5 do Ensaio 2.....	107

Figura 6.53 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 8 da Placa 5 do Ensaio 2.....	108
Figura 6.54 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 9 da Placa 10 do Ensaio 2.....	109
Figura 6.55 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 10 da Placa 10 do Ensaio 2....	110
Figura 6.56 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 11 da Placa 6 do Ensaio 2.....	111
Figura 6.57 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 12 da Placa 6 do Ensaio 2.....	112
Figura 6.58 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 13 da Placa 9 do Ensaio 2.....	112
Figura 6.59 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 14 da Placa 10 do Ensaio 2....	113
Figura 6.60 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 15 da Placa 10 do Ensaio 2.....	114
Figura 6.61 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 16 da Placa 9 do Ensaio 2.....	115
Figura 6.62 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 17 da Placa 6 do Ensaio 2.....	116
Figura 6.63 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 18 da Placa 3 do Ensaio 2.....	117
Figura 6.64 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 19 da Placa 3 do Ensaio 2.....	118
Figura 6.65 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>Plex</i> 20 da Placa 5 do Ensaio 2....	119
Figura 6.66 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 22 da Placa 9 do Ensaio 2.....	120
Figura 6.67 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 23 da Placa 10 do Ensaio 2....	121
Figura 6.68 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 24 da Placa do Ensaio 2.....	121
Figura 6.69 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 25 da Placa 5 do Ensaio.....	122
Figura 6.70 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 26 da Placa 2 do Ensaio 2.....	123
Figura 6.70 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 26 da Placa 6 do Ensaio 2.....	124
Figura 6.71 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 27 da Placa 5 do Ensaio 2.....	124
Figura 6.72 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 28 da Placa 6 do Ensaio 2.....	125
Figura 6.73 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 30 da Placa 9 do Ensaio 2.....	126
Figura 6.74 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 31 da Placa 6 do Ensaio 2.....	127
Figura 6.75 – Organização da placa de <i>iPLEX MassARRAY</i> com 35 <i>plexes</i> no Ensaio 3.....	130
Figura 6.76 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 1 da Placa 11 do Ensaio 3.....	132
Figura 6.77 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 2 da Placa 15 do Ensaio.....	134
Figura 6.78 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 3 da Placa 15 do Ensaio 3.....	135

Figura 6.79 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 4 da Placa 16 do Ensaio 3.....	136
Figura 6.80 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 5 da Placa 19 do Ensaio 3.....	137
Figura 6.81 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 6 da Placa 16 do Ensaio 3.....	139
Figura 6.82 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 7 da Placa 14 do Ensaio 3.....	140
Figura 6.83 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 8 da Placa 13 do Ensaio 3.....	142
Figura 6.84 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 9 da Placa 17 do Ensaio 3.....	143
Figura 6.85 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 10 da Placa 16 do Ensaio 3.....	145
Figura 6.86 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 11 da Placa 13 do Ensaio 3.....	146
Figura 6.87 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 12 da Placa 18 do Ensaio 3....	147
Figura 6.88 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 13 da Placa 11 do Ensaio 3....	148
Figura 6.89 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 14 da Placa 14 do Ensaio 3....	150
Figura 6.90 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 15 da Placa 14 do Ensaio 3.....	151
Figura 6.91 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 16 da Placa 17 do Ensaio 3....	152
Figura 6.92 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 17 da Placa 15 do Ensaio 3....	154
Figura 6.93 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 18 da Placa 17 do Ensaio 3....	155
Figura 6.94 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 19 da Placa 12 do Ensaio 3....	156
Figura 6.95 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 20 da Placa 11 do Ensaio 3.....	157
Figura 6.96 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 22 da Placa 19 do Ensaio 3.....	158
Figura 6.97 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 23 da Placa 15 do Ensaio 3....	159
Figura 6.98 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 24 da Placa 14 do Ensaio 3....	160
Figura 6.99 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 25 da Placa 16 do Ensaio 3.....	161
Figura 6.100 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 26 da Placa 11 do Ensaio 3....	162
Figura 6.101 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 27 da Placa 17 do Ensaio 3....	163
Figura 6.102 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 28 da Placa 14 do Ensaio 3....	164
Figura 6.103 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 29 da Placa 18 do Ensaio 3....	165
Figura 6.104 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 30 da Placa 15 do Ensaio.....	166
Figura 6.105 – Figura A e B - <i>Primer Adjustment Report</i> para o <i>plex</i> 31 da Placa 13 do Ensaio 3....	167

Figura 6.106 – Figura A e B - *Primer Adjustment Report* para o *plex* 32 da Placa 15 do Ensaio 3...168

Figura 6.107 – Figura A e B - *Primer Adjustment Report* para o *plex* 33 da Placa 19 do Ensaio....170

Figura 6.108 – Figura A - *Primer Adjustment Report* para o *plex* 34 da Placa 17 do Ensaio 3.....171

Figura 6.109 – Figura A - *Primer Adjustment Report* para o *plex* 35 da Placa 12 do Ensaio 3.....173

1. Introdução

1.1. Miocardiopatias

A rápida evolução da genética molecular no âmbito da cardiologia na última década, levou à necessidade da actualização do conceito de miocardiopatias (Maron, 2006). As miocardiopatias são caracterizadas como um grupo de doenças do miocárdio, acarretando uma disfunção cardíaca, arritmias ou em ultima instância, podendo conduzir a morte súbita cardíaca. No geral, as miocardiopatias representam a maior causa de morbilidade e mortalidade, quer em crianças e em jovens adultos (Hughes e McKenna, 2005).

As miocardiopatias podem ser classificadas em miocardiopatias primárias, quando afectam apenas o músculo cardíaco e em secundárias, quando afectam o miocárdio como consequência de doenças sistémicas (Richard, 2010).

Existem quatro tipos de miocardiopatias primárias de origem genética, sendo agrupadas de acordo com critérios anatómicos e funcionais: miocardiopatia hipertrófica (MH), miocardiopatia dilatada (MD), miocardiopatia restritiva (MR), displasia arritmogénica do ventrículo direito e miocardiopatia não compactada do ventrículo esquerdo (Richard, 2010).

Na MH observa-se um aumento localizado da massa do miocárdio, podendo manifestar-se em termos morfológicos por um padrão de hipertrofia ao nível do septo interventricular (2/3 dos casos) ou ao nível do ápice ventricular, com diminuição do volume da câmara ventricular, como se observa na Figura 1.1A (Hershberguer, 2009). Ao nível fisiológico, a MH apresenta um aumento da função sistólica (período de contracção muscular do miocárdio), enquanto a função diastólica é reduzida (período de relaxamento muscular do miocárdio) (Morimoto, 2008). Por sua vez, a MD caracteriza-se por uma dilatação ventricular progressiva com redução da função ventricular, como se pode observar na Figura 1.1C (Morimoto, 2008; Seidman e Seidman, 2001)

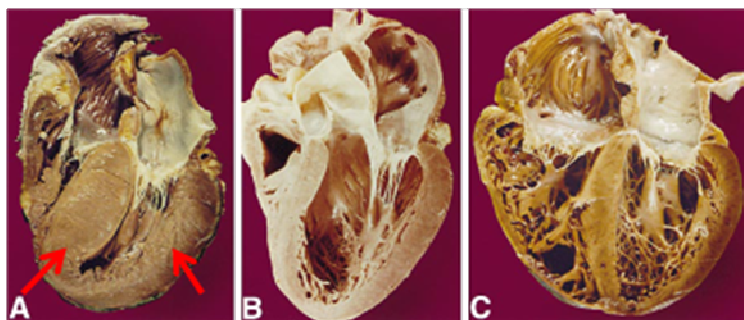


Figura 1.1 - Diferenças morfológicas entre um coração com miocardiopatia hipertrófica (Figura 1.1A), um coração saudável (Figura 1.1B) e um coração com miocardiopatia dilatada (Figura 1.1C). Na Figura 1.1A observa-se um espessamento da parede ventricular (indicada pela seta à direita na figura) e no septo inter-

ventricular (indicada pela seta à esquerda na figura), com diminuição do volume da câmara ventricular (Morimoto, 2008; Seidman e Seidman, 2001).

As miocardiopatias podem ser agrupadas, de acordo com critérios genéticos, em formas familiares e em formas não familiares (esporádicas). A forma familiar ou genética refere-se à ocorrência da doença em mais que um membro da família, enquanto na forma não familiar a doença manifesta-se apenas num paciente *índex*, não se manifestando nos restantes membros da família (Elliott, 2008).

1.2. Miocardiopatia hipertrófica

1.2.1. Caracterização da doença

A MH é a doença genética mais frequente do foro cardíaco, caracterizada por se tratar de uma patologia bastante complexa, com uma heterogeneidade de características fenotípicas, que se reflectem numa variedade de manifestações clínicas (Olivotto, 2009).

Tal como referido anteriormente, a principal característica morfológica da MH centra-se na hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE), podendo esta desenvolver-se durante a puberdade até ao início da idade adulta (Olivotto e Cecchi, 2009). A distribuição da hipertrofia do ventrículo esquerdo é assimétrica, desenvolvendo padrões que são extremamente variáveis (Olivotto e Cecchi, 2009).

O processo de hipertrofia pode desenvolver-se em qualquer segmento de ventrículo esquerdo, estendendo-se ocasionalmente para o ventrículo direito e músculos papilares (Harrigan, 2008; Olivotto e Cecchi, 2009). O septo interventricular apresenta uma espessura variável que pode variar entre os 13 a 15 mm (hipertrofia leve) e os 30 mm (hipertrofia severa), Figura 1.1 (Olivotto e Cecchi, 2009).

1.2.2. Epidemiologia

A MH apresenta uma prevalência de 1:500 indivíduos, afectando igualmente homens e mulheres (Ho, 2009). Esta estimativa é determinada como base na espessura da parede ventricular esquerda (< 15 mm). O valor da verdadeira estimativa pode vir a ser bastante mais elevado (1:300), devido à penetrância variada desta doença (Marian, 2010).

Em 55 a 70% dos casos de MH são identificadas mutações num dos genes que codificam para proteínas do sarcómero cardíaco (Ho, 2009)

1.2.3. Sintomatologia

A heterogeneidade das manifestações clínicas na MH, anteriormente referida, acarreta que uma percentagem significativa dos doentes com MH seja assintomática ou manifestem apenas alguns sintomas, podendo nestes doentes ocorrer uma progressão natural da doença, com aumento da severidade dos sintomas, culminando em paragem cardíaca. Nalguns casos, a morte súbita poderá ser a única manifestação da doença (Alcalai, 2008).

A dispneia e dor no peito são os sintomas mais comuns de MH, apesar de poderem ocorrer sintomas adicionais a estes. A dispneia ocorre devido a uma anomalia na função diastólica, provocando um aumento da pressão diastólica durante o exercício físico, enquanto a dor no peito pode surgir devido a uma hipoperfusão do miocárdio (Ho, 2010; Marian, 2010).

É comum ocorrerem palpitações sendo frequentemente associadas a delírios, tonturas e ocasionalmente síncope, que apesar de serem pouco frequentes, podem ser considerados um dos sintomas mais graves, prognosticando o risco de morte súbita. A fibrilhação auricular e arritmias supra ventriculares podem também ser um dos sintomas associados a MH, estando associadas com uma evolução de sintomas adversos (Ho, 2010; Marian, 2010)

1.2.4. Histopatologia

Em termos patológicos, a MH é caracterizada por uma hipertrofia e desarranjo dos miócitos cardíacos (cardiomiócitos), fibrose intersticial, hiperplasia das artérias coronárias e por anomalias na válvula mitral, como se pode observar na Figura 1.2 (Marian, 2010).

Na Figura 1.2B observa-se um desarranjo dos cardiomiócitos constatando-se a sua profunda desorganização, variação de tamanho e de forma, com formação de interligações anómalas entre cardiomiócitos e com perda do seu alinhamento fisiológico (Elliott, 2004; Olivotto, 2009).

Este desarranjo é extremamente variável, com uma distribuição dos cardiomiócitos desigual ao longo de toda a extensão, sendo independente do grau de hipertrofia ventricular (Elliott, 2004; Olivotto, 2009). As consequências funcionais deste desarranjo podem afectar a mecânica do ventrículo esquerdo, interferindo com os movimentos fisiológicos de contracção e relaxamento e representam um substrato potencial para arritmias ventriculares (Elliott, 2004; Olivotto, 2009). O desarranjo dos cardiomiócitos é a característica histopatológica mais elucidativa de MH, compreendendo por vezes cerca de 20% do ventrículo (Marian, 2010).

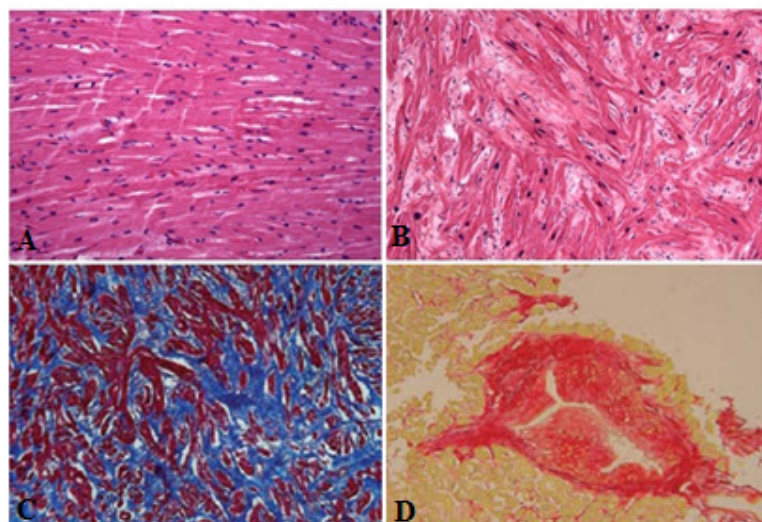


Figura 1.2 – Características histológicas do miocárdio cardíaco com MH. Comparação histológica entre um miocárdio normal apresentando um arranjo ordenado dos miócitos cardíacos (Figura 1.2A) com um miocárdio hipertrofiado, que apresenta um desarranjo total dos miócitos, onde estes se encontram desorganizados de uma forma anormal e em ângulos variáveis (Figura 1.2B). O miocárdio hipertrofiado também pode apresentar fibrose intersticial, devido a uma acumulação de fibras de colagénio no espaço intersticial cardíaco (Figura 1.2C) e uma remodelação microvascular onde a arteríola inter-miocárdica coronária apresenta um espessamento na sua parede, devido ao fenómeno de hipertrofia (Figura 1.2D) (Adaptado de Ho, 2010; Olivotto, 2009).

A fibrose cardíaca ocorre quando existem danos no miocárdio, que devido à não regeneração deste tipo de células, este tecido é substituído por tecido fibroso (fibras de colagénio) não contráctil. Ocorre uma acumulação da matriz extra-celular, particularmente por fibras de colagénio no espaço intersticial cardíaco, sendo reconhecido como um dos determinantes da disfunção ventricular (Lammey, 2008).

No miocárdio podem ocorrer dois tipos de fibrose, a fibrose por substituição (*scarring*) e a fibrose intersticial. A fibrose por substituição é causada pela substituição ou dano das células do miocárdio, apresentando fibrose tecidual, resultando de algum evento de vascularização, como o enfarte de miocárdio. Por outro lado, a fibrose intersticial (Figura 1.2C), ocorre quando uma rede de fibras do colagénio se espalha difusamente através das fibras do músculo cardíaco, provocando estímulos externos como a aumento de pressão e volume (Lammey, 2008).

Existem outros factores que contribuem para uma disfunção microvascular, para além do desarranjo dos miócitos, como sejam a redução da densidade capilar e um aumento das forças que comprimem o espaço extravascular (Olivotto, 2009).

1.2.5. Penetrância

Tal como referido anteriormente, a penetrância desta doença é bastante variável, dependendo da idade, sendo que muitos dos pacientes podem demonstrar formas de hipertrofia variada ao longo dos anos. Por vezes, subestima-se esta patologia, dado que o diagnóstico clínico não é suficientemente robusto para distinguir um caso de MH verdadeiro de um caso de miocardiopatia metabólica (Marian, 2010).

1.3. Músculo Cardíaco

O miocárdio ou músculo cardíaco é considerado a própria parede do coração. Este constitui um dos três tipos principais de músculos do corpo humano, possuindo características histológicas e funcionais, do músculo-esquelético e do músculo liso, respectivamente. A sua principal função a contração cardíaca (Fatkin e Graham, 2002).

1.3.1. Fisiologia celular dos cardiomiócitos

Cada célula do miocárdio, designada de cardiomiócito, é constituída por um núcleo central, envolvido por uma membrana plasmática, o sarcolema e por numerosas fibras musculares. As fibras musculares cardíacas são constituídas por miofibrilas que formam longas cadeias de miofilamentos – os sarcómeros, como se pode observar na Figura 1.3 (Fatkin e Graham, 2002).

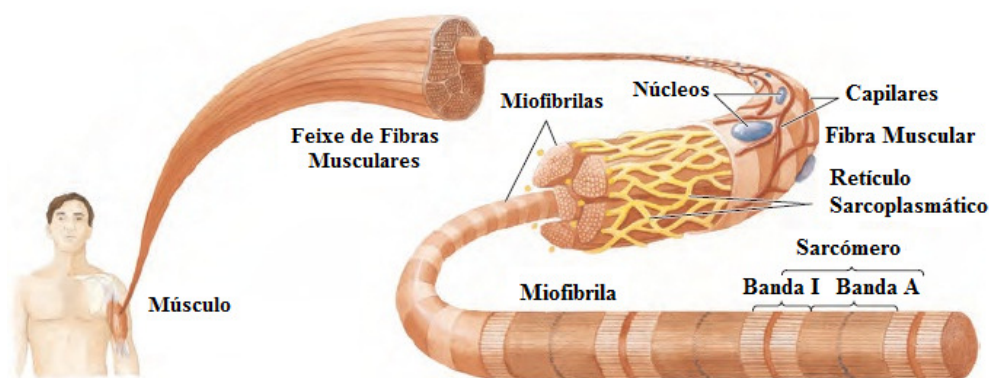


Figura 1.3 - Constituição do músculo cardíaco. O músculo cardíaco é constituído por inúmeras fibras musculares, sendo estas compostas pelos miócitos. Os miócitos são compostos por miofibrilas, que formam longas cadeias de miofilamentos, designados por sarcómero (Adaptado de Fatkin e Graham, 2002; Nelson e Cox, 2005).

1.3.2. Sarcômero Cardíaco

O sarcômero caracteriza-se por ser a unidade estrutural e funcional do músculo cardíaco, compreendido entre filamentos grossos e finos, que representam cerca de 50% do volume celular. Os filamentos grossos apresentam um diâmetro próximo de 15 nm, sendo compostos predominantemente pela cadeia pesada β da miosina cardíaca (β MHC; codificada pelo gene *MYH7*), cadeia pesada α da miosina cardíaca (α MHC; codificada pelo gene *MYH6*), pela proteína C de ligação à miosina (MyBP-C; codificada pelo gene *MYBPC3*) e pelas proteínas da cadeia leve regulatória e essencial da miosina cardíaca (codificadas pelos genes *MYL2* e *MYL3*, respectivamente), enquanto os filamentos finos tem um diâmetro próximo dos 5 nm, sendo constituídos pelas proteínas actina cardíaca, (codificada pelo gene *ACTC1*), α -tropomiosina (codificada pelo gene *TPM1*) e pelo complexo das troponinas (troponina C (TnC), troponina I (TnI) e troponina T (TnT)) (codificadas pelos genes *TNNC1*, *TNNI3* e *TNNT2*, respectivamente), como se observa na Figura 1.4 (Fatkin e Graham, 2002).

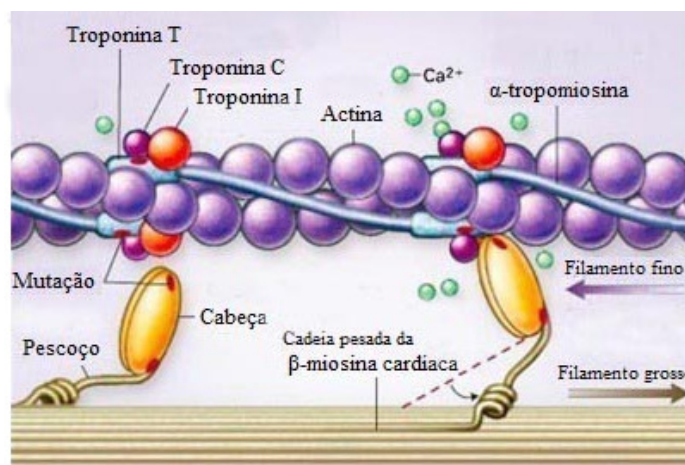


Figura 1.4 – Constituintes principais do sarcômero cardíaco (Adaptado de Ho, 2010; Seidman e Seidman, 2001)

Cada sarcômero compreende uma banda A (compreendida entre filamentos grossos e finos) com uma linha M central (composta unicamente por filamentos grossos). Uma porção da banda A é composta por uma zona H (não existe interligação entre os filamentos grossos e finos), encontrando-se rodeada por uma zona C. Cada lado da Banda A encontra-se delimitado pelas bandas I, que se encontram rodeadas por linhas Z, como se observa na Figura 1.5 (Fatkin e Graham, 2002).

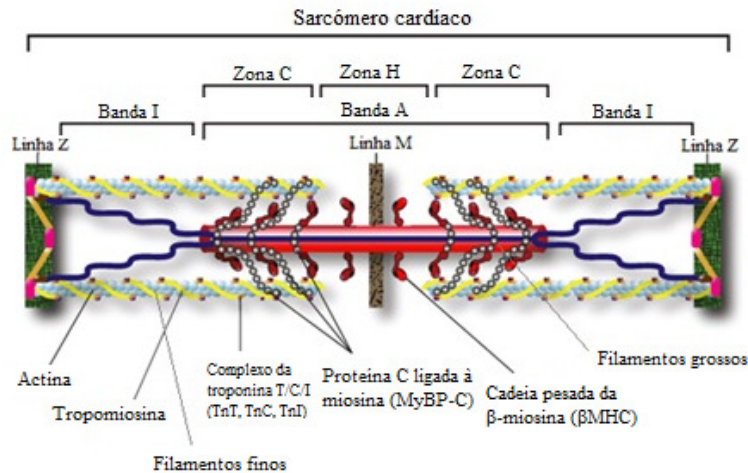


Figura 1.5 - Esquema representativo do sarcômero cardíaco. O sarcômero cardíaco é composto por filamentos grossos e por filamentos finos. Cada sarcômero é constituído por uma Banda A com uma linha M central. Uma porção da banda A é composta por uma zona H, encontrando-se esta rodeada por uma zona C. Cada lado da Banda A encontra-se delimitado pelas bandas I, que se encontram rodeadas por linhas Z (Adaptado de Fatkin Graham, 2002; Rodríguez, 2009).

O disco Z (que contem a linha Z) é formado por uma rede de proteínas interligadas entre si, com a função de manter a organização dos miofilamentos através das ligações entre a titina com os filamentos finos dos sarcômeros adjacentes. A titina (codificada pelo gene *TTN*) é uma proteína de grandes dimensões, que se estende desde a linha Z até à linha M, contribuindo para a montagem e organização do sarcômero, sendo uma das principais determinantes das propriedades elásticas da miofibrila cardíaca (Fatkin e Graham, 2002).

1.3.3. Contração muscular cardíaca

A contração cardíaca ocorre pelo deslizamento e interligação dos filamentos finos com os filamentos grossos do sarcômero cardíaco. (Cirino e Ho, 2009; Seidman e Seidman, 2001).

A força contráctil do músculo é gerada pela interação entre duas proteínas, a miosina e a actina, localizadas nestes filamentos (Nelson e Cox, 2005).

Desta forma, o deslizamento dos miofilamentos ocorre através da interação do filamento grosso, pela cabeça globular da cadeia pesada β da miosina, que possui actividade ATPase mediante a hidrólise do ATP, aos locais de ligação à actina no filamento fino. A alteração da conformação da cabeça da miosina, dependente de energia, origina a libertação do complexo actina-miosina. A cabeça da miosina é considerada frequentemente o motor do sarcômero (Cirino e Ho, 2009; Seidman e Seidman, 2001).

A contração cardíaca, exemplificada na Figura 1.6, inicia-se quando a concentração de Ca^{2+} citosólico aumenta, ligando-se este à troponina C. Esta ligação permite libertar a inibição da troponina I, expondo assim os locais de ligação à actina e permitindo a sua interação com a cabeça da miosina. O ATP liga-se ao domínio da cabeça globular da miosina, alterando a conformação dos locais de ligação desta com a actina, de modo que a cabeça do domínio seja deslocada ao longo do filamento fino (aproximadamente 10 nm) (Cirino e Ho, 2009; Seidman e Seidman, 2001). Após a hidrólise do ATP e da libertação do ADP e do P_i , ocorre geração da força (denominada por *power stroke*), em que a conformação inicial da miosina é restaurada, como se observa na Figura 1.6 (Seidman e Seidman, 2001).

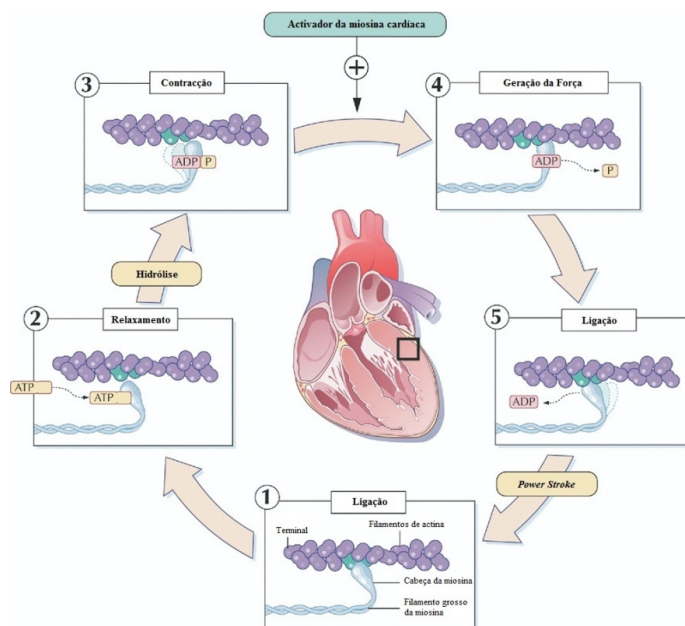


Figura 1.6 – Ciclo da contracção cardíaca. A contração do músculo cardíaco inicia-se pela ligação do Ca^{2+} , libertado do retículo sarcoplasmático, ao complexo das troponinas (em particular à subunidade C) e α -tropomiosina, permitindo a libertação da inibição da interação entre a miosina e a actina pela troponina cardíaca I. A actividade de ATPase e a ligação à actina pela cabeça globular da miosina resulta numa alteração de conformação que dobra o pescoço da miosina e resultando no deslizamento do filamento grosso em relação ao filamento fino. Na ausência de Ca^{2+} (retido no retículo sarcoplasmático) dá-se a inibição da interação entre a actina e a miosina pela troponina I (Adaptado de DeGoma, 2006).

A transmissão da força gerada pelo sarcómero para o citoesqueleto do cardiomiócito ocorre através de um complexo de moléculas, incluindo a proteína C de ligação à miosina cardíaca, a titina, a distrofina (codificada pelo gene *DYS*) e alguns péptidos sarcoglicanos associados. Estes péptidos fornecem elasticidade para a célula, podendo modular a força contráctil. A contração termina quando o Ca^{2+} volta ao retículo sarcoplasmático, diminuindo a sua concentração citoplasmática (Cirino e Ho, 2009; Seidman e Seidman, 2001).

1.4. Genética Molecular da miocardiopatia hipertrófica

A natureza hereditária e o padrão de transmissão autossómico dominante da MH têm sido amplamente estudados, desde que em 1980 começaram a surgir os primeiros estudos de *linkage*, conduzindo à descoberta de mutações nos genes que codificam para os componentes contrácteis, estabelecendo o paradigma em que a MH é uma doença do sarcómero (Ho, 2010).

Assim sendo, a MH é a doença cardíaca monogénica mais frequente, apresentando uma heterogeneidade genética substancial. Já foram identificadas mais de 1000 mutações distintas em mais de 30 genes, que codificam para proteínas sarcoméricas e não sarcoméricas, sem especificidade de raça ou etnia, como se pode analisar na Tabela 1.1 (HGMD® <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>; Ho, 2010; Santos, 2011 (submetido BMC Medical Genetics)).

Estudos genéticos das mutações ocorridas em alguns desses genes, nomeadamente *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *ACTC1*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3* e *MYH6*, têm demonstrado que a MH resulta maioritariamente de mutações em proteínas sarcoméricas cardíacas, com funções contrácteis, estruturais e regulatórias (Alcalai, 2008; Cardim, 2005; Fatkin e Graham, 2002; Gomes, 2002; Ho, 2010; Klabunde, 2004; Morimoto, 2008; Santos, 2011 (submetido BMC Medical Genetics)). Por outro lado, mutações noutros genes, tais como os que codificam para as proteínas da linha Z (proteína LIM do músculo cardíaco (*CSRP3*), teletonina (*TCAP*), miozenina 2 (*MYOZ2*), α -actinina (*ACTN2*), vinculina (*VCL*) e domínio 1 de repetição da anquirina (*ANKRD1*)) e para proteínas não sarcoméricas são menos frequentes, sendo conhecidas como causas raras da MH (Arimura, T., 2009; Faulkner, 2001; Geier, 2008; Santos, 2011 (submetido BMC Medical Genetics)) (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Genes que codificam para as proteínas sarcoméricas e não sarcoméricas e respectivas mutações associadas à MH (Alcalai, 2008; HGMD® Janeiro 2012; Ho, 2010; Santos, 2011 (submetido BMC Medical Genetics))

Proteína	Gene	Locus	Número de mutações associadas com MH
Proteínas Sarcoméricas			
Actina cardíaca	<i>ACTC1</i>	15q11-q14	18
Proteína C de ligação à miosina cardíaca	<i>MYBPC3</i>	11q11.2	359
Cadeia pesada α da miosina cardíaca	<i>MYH6</i>	14q12	23
Cadeira pesada β da miosina cardíaca	<i>MYH7</i>	14q12	381
Cadeia leve regulatória da miosina	<i>MYL2</i>	12q23-q24.3	13

Cadeia leve essencial da miosina	<i>MYL3</i>	3p21.3-p21.2	12
Troponina cardíaca Cardíaca C	<i>TNNC1</i>	3p21.3-p14.3	13
Troponina I cardíaca	<i>TNNI3</i>	19p13.4	57
Troponina T cardíaca	<i>TNNT2</i>	1q32	63
α -Tropomiosina	<i>TPM1</i>	15q22.1	25
Titina	<i>TTN</i>	2q31	30
Caveolina 3	<i>CAV3</i>	3p25	1
Desmina	<i>DES</i>	2q35	1
Obscurina	<i>OBSCN</i>	1q42.13	1
Proteínas do Disco Z			
Proteína LIM do músculo cardíaco	<i>CSRP3</i>	11p15.1	14
Miozenina 2	<i>MYOZ2</i>	4q26-q27	2
Vinculina	<i>VCL</i>	10q22.1-q23	1
Teletonina	<i>TCAP</i>	17q12	15
Proteínas envolvidas na sinalização do Ca^{2+}			
Calsequestrina 2	<i>CASQ2</i>	1p13.3-p11	1
Junctofilina 2	<i>JPH2</i>	20q13.12	4
Cinase 2 da cadeia leve da miosina	<i>MYLK2</i>	20q13.31	2
Fosfolamban	<i>PLN</i>	6q22.1	11
Outras proteínas não sarcoméricas			
Proteína associada à montagem da estrutura do citocromo C oxidase, homólogo 15	<i>COX15</i>	10q24	2
Miosina VI	<i>MYO6</i>	6q13	1
Membro 4 da família 25 dos transportadores de soluto	<i>SCL25A4</i>	4q35	1
Proteínas envolvidas nas fenocópias			
Frataxina	<i>FXN</i>	9q13-q21.1	1
Subunidade γ_2 regulatória da AMP cinase	<i>PRKAG2</i>	7q36.1	15
Proteína membrana associada ao lisossoma	<i>LAMP2</i>	Xq24	1
Proto-oncogene s erina/treonina-proteína cinase	<i>RAF1</i>	3p25	1

1.5. Proteínas do Sarcómero Cardíaco

Como anteriormente explicado, a contração e o relaxamento do músculo cardíaco são mecanismos mediados pelo deslizamento dos filamentos grossos e finos. Para além dos principais componentes dos filamentos sarcoméricos, a miosina e a actina, o sarcómero

cardíaco possui outras proteínas acessórias, que interagem entre si, possuindo um papel fundamental na montagem, manutenção da integridade estrutural e regulação da actividade contráctil (Flashman, 2004).

1.5.1. Proteína C de ligação à miosina cardíaca

A proteína C de ligação à miosina cardíaca localiza-se na banda A do sarcómero cardíaco, sendo um polipéptido com 1274 aminoácidos, apresentando funções estruturais. Estas funções estruturais estão presentes durante a embriogénese (no alinhamento e montagem dos filamentos grossos) e na idade adulta, ligando-se à titina (proteína do citoesqueleto) e à cadeia pesada β da miosina cardíaca (Cardim, 2005).

Além da função estrutural, esta proteína também possui funções regulatórias, participando no controlo dinâmico da contração cardíaca, mediada pelo sistema adrenérgico, através da fosforilação dependente das catecolaminas (Cardim, 2005). A proteína C de ligação à miosina possui três isoformas, sendo a isoforma cardíaca MyBP-C, expressa exclusivamente no tecido cardíaco (Fatkin e Graham, 2002; Flashman, 2004).

O gene *MYBPC3* que codifica para esta proteína localiza-se no cromossoma 11 e tem 37 exões (Fatkin e Graham, 2002). Cerca de 30 a 40% dos casos de MH são causados por mutações neste gene *MYBPC3*, tendo já sido identificadas 359 mutações (HGMD® <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=MYBPC3> acedido em Dezembro de 2011; Ho, 2010; Santos, 2011 (submetido BMC Medical Genetics)). As mutações *missense* são as mais comuns, podendo também ocorrer mutações *nonsense*, alterações de locais de *splicing* e pequenas inserções e deleções (Ho, 2010).

As consequências destas mutações caso se localizem nos domínios de ligação à miosina ou à titina passam pela perda da sua função estrutural, na montagem do sarcómero cardíaco (Ho, 2010). Mutações neste gene encontram-se geralmente associadas ao aparecimento tardio da MH, a uma menor hipertrofia do septo ventricular, a uma menor penetrância e a um melhor prognóstico em comparação com mutações ocorridas em outros genes (Ho, 2010).

1.5.2. Miosina Cardíaca

A miosina II é uma proteína motora e a principal constituinte do filamento grosso do sarcómero cardíaco, com cerca de 300 moléculas por filamento (Hamdani, 2008).

Existem duas isoformas expressas no músculo cardíaco, a cadeia pesada β da miosina, β MHC e a cadeia pesada α da miosina, α MHC. Durante o processo de embriogénese cardíaca, a isoforma α MHC encontra-se em abundância, quer nas aurículas quer nos ventrículos, enquanto na idade adulta a isoforma β MHC é expressa predominantemente nos ventrículos e a α MHC é expressa nas aurículas (Morimoto, 2008). A miosina é igualmente constituída por duas cadeiras leves, essencial e regulatória (MLC) (codificadas pelos genes *MYL3* e *MYL2*, respectivamente), como se observa na Figura 1.7 (Hamdani, 2008).

Cada molécula de miosina contém duas cabeças, que servem de local de armazenamento da adenosina trifosfatase miosina (miosina ATPase), uma enzima que hidrolisa a adenosina trifosfato (ATP), como se verifica na Figura 1.7 (Klabunde, 2004).

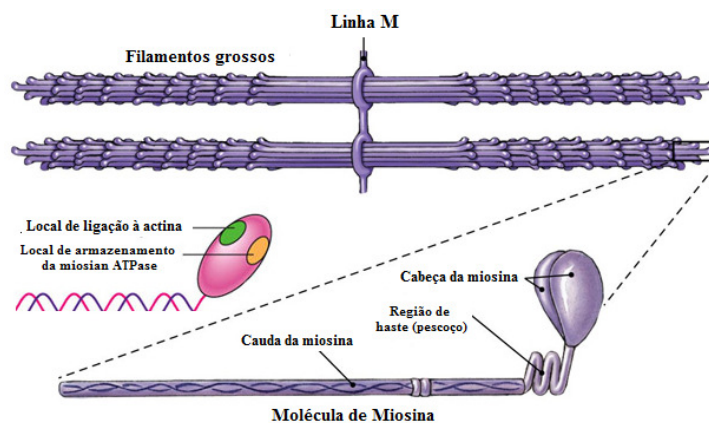


Figura 1.7 – Miofilamentos grossos cardíacos, salientando-se a estrutura da miosina II. Os filamentos grossos são compostos por moléculas de miosina II, em que cada molecular possui duas cabeças, com locais de ligação ao ATP e à actina (indicadas na figura pelas setas ovais amarelas e verdes respetivamente) (Adaptado de <http://samedical.blogspot.com/2010/07/contraction-of-skeletal-muscle.html> acedido a 09 de Janeiro de 2012).

1.5.2.1. Cadeia pesada β da miosina cardíaca

A β -MyHC cardíaca é uma proteína abundante do sarcómero, com função contráctil, possuindo, tal como referido acima, três segmentos funcionais: uma cabeça globular, uma região de haste (pescoço) e um segmento terminal (cauda). A cabeça da miosina (amino-terminal) liga-se ao ATP, contendo actividade de ATPase e possuindo um domínio ligado à actina para formar um complexo actina - miosina, crucial para a geração da força, como se observa na Figura 1.7 e 1.8. A região da haste participa no processo de contração cardíaca e o domínio terminal-carboxílico interage com as cadeias leves da miosina cardíaca, como se pode observar pela Figura 1.8 (Ho, 2010).

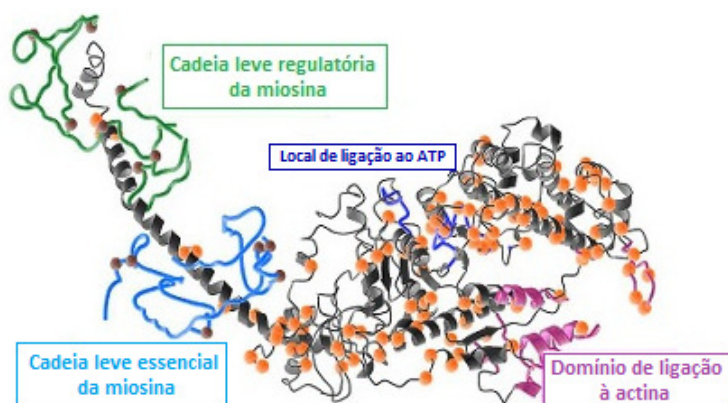


Figura 1.8 – Estrutura molecular da cadeia pesada da miosina cardíaca e localização de mutações associadas a MH. Este modelo tridimensional foi obtido por Cristalografia raio-X baseado no esqueleto da cadeia pesada da miosina de galinha. O domínio de ligação à actina está representado pela cor roxa. As cadeias leve essencial e regulatória da miosina cardíaca encontram-se representadas pela cor azul clara e verde respectivamente. As mutações associadas a MH encontra-se a cor de laranja e as mutações na cadeia leve estão a cor castanha (Adaptado de Ho, 2010).

Em 1989, estudos de *linkage* permitiram identificar a primeira mutação associada à MH no gene que codifica para a cadeia pesada β da miosina cardíaca (*MYH7*) (Jarcho, 1989). A partir daí, já foram identificadas cerca de 381 associadas a esta proteína, representando cerca de 30 a 40% dos casos de MH (HGMD[®] <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=MYH7> acedido a 07 de Dezembro de 2011; Ho, 2010). O gene *MYH7* encontra-se localizado no cromossoma 14q12, contém 40 exões que codificam para uma proteína de 1274 aminoácidos (Cardim, 2005; *CardioGenomics* http://genepath.med.harvard.edu/seidman/cg3/genes/MYH7_exons.html#top acedido a 12 de Janeiro de 2012).

Mutações ocorridas neste gene são a causa mais frequente da ocorrência de MH, na sua grande maioria, mutações *missense*, muitas das quais levam a alterações em aminoácidos localizados essencialmente na região globular ou entre a junção da cabeça da miosina com o terminal. A mutação *missense* Arg403Gln tem sido amplamente estudada, sendo geralmente Descrita e associada a famílias com MH (Bashyam, 2003). O resíduo Arg-403 localiza-se na cabeça da miosina, interagindo com a actina. A substituição do resíduo de arginina (Arg) pela glutamina (Gln) resulta numa perda de carga, ocorrendo uma substituição de uma guanina por uma adenina (G>A) (Fatkin e Graham, 2002; *CardioGenomics* http://genepath.med.harvard.edu/seidman/cg3/muts/MYH7_Arg403Gln.html acedido a 25 de Setembro de 2011).

1.5.2.2. Cadeia pesada α da miosina cardíaca

A cadeia pesada α da miosina cardíaca é caracterizada pela sua elevada actividade de ATPase durante o processo de contração muscular, fazendo parte do processo de regulação da função cardíaca, possuindo um papel crucial na função normal do miocárdio (Carniel, 2005). O gene *MYH6* que codifica para esta proteína com 1939 aminoácidos, encontra-se localizado no cromossoma 14q12 e tem 39 exões (*Gene Cards*[®] <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYH6> acedido a 04 de Janeiro de 2012; *Mendelian genes* https://grenada.lumc.nl/LOVD2/mendelian_genes/refseq/MYH6_table.html acedido a 12 de Janeiro de 2012).

Em humanos, mutações neste gene tem sido associadas à MH, tendo sido descritas até à data cerca de 23 mutações (Carniel, 2005; HGMD[®] <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=MYH6> acedido a 11 de Dezembro de 2011). A mutação Gln1065His (Q1056H), alteração de uma Gln por uma histidina (His) (HGMD[®] <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php> acedido a 28 de Setembro de 2011) encontra-se associada a um fenótipo de MH severo, caracterizado pelo aparecimento precoce da doença, uma hipertrofia do ventrículo esquerdo severa e até mesmo conduzir a morte súbita (Carniel, 2005).

1.5.2.3. Cadeia leve regulatória e cadeia leve essencial da miosina cardíaca

A cadeia leve da miosina pertence a uma superfamília de proteínas com ligação ao cálcio. Tal como referido anteriormente (secção 1.5.2), existem dois tipos de cadeias leves da miosina cardíaca codificadas por genes distintos: a essencial (*MYL3*) e a regulatória (*MYL2*), existindo ainda outros membros pertencentes a esta família de proteínas com ligação ao cálcio, como a troponina cardíaca C (*TNNC1*) e a calmodulina (Fatkin e Graham, 2002).

O músculo cardíaco possui duas isoformas reguladoras da cadeia leve da miosina cardíaca, a isoforma MLC-2 lenta expressa no ventrículo (e codificada pelo gene *MYL2*) e no músculo-esquelético e a isoforma MLC-2 expressa na aurícula. O gene *MYL2* possui 7 exões que codificam para uma proteína com 166 aminoácidos, tendo já sido reportadas 13 mutações nesta proteína (Fatkin e Graham, 2002; HGMD[®] <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=MYL2> acedido a 08 de Dezembro de 2011).

No músculo cardíaco encontram-se presentes duas das cinco isoformas da cadeia leve essencial da miosina, onde a isoforma leve MLC-1 é expressa no ventrículo e no músculo-esquelético. O gene *MYL3* contém 7 exões, 6 dos quais codificam para uma proteína

com 195 aminoácidos, sendo conhecidas e relatadas 12 mutações (Fatkin e Graham, 2002; HGMD® <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=MYL3> acessado a 08 de Dezembro de 2011).

Pensa-se que os domínios MLC influenciem a eficiência mecânica das ligações e a velocidade de contração, contudo ainda não foi reportada nenhuma função específica destes. Ensaio *in vitro* demonstram que a velocidade de deslizamento da actina aumenta devido a mutações na cadeia leve essencial da miosina (mutação Met149Val) enquanto mutações na cadeia leve regulatória da miosina (mutação Glu22Lys) não provocam nenhum efeito (Fatkin e Graham, 2002). Estas duas mutações *missense* foram avaliadas em modelos de ratinhos transgênicos, em que se constatou que a mutação Met158Val, análoga à mutação Met149Val em humanos, encontra-se relacionada com o desarranjo miofibrilar e fibrose. Quando ocorre a substituição da metionina (Met) pela valina (Val), verificam-se alterações na actividade da ATPase e da geração da força, reduzindo a potência, devendo-se a uma substituição de uma adenina por uma guanina, A>G (*CardioGenomics* http://genepath.med.harvard.edu/seidman/cg3/muts/MYL3_Met149Val.html acessado a 25 de Setembro de 2011; Fatkin e Graham, 2002). A mutação Glu22Lys encontra-se associada com a geração da força, ocorrendo uma substituição do glutamato (Glu) pela lisina (Lys), ocorrendo uma alteração de uma guanina por uma adenina, G>A (Fatkin e Graham, 2002; *CardioGenomics* http://genepath.med.harvard.edu/seidman/cg3/muts/MYL2_Glu22Lys.html acessado a 25 de Setembro de 2011).

1.5.3. Actina cardíaca

A actina pertence a um grupo de proteínas altamente conservadas, que fazem parte do citoesqueleto e que se encontram associadas a vários tipos de dinâmica/mobilidade celular. A actina G é uma proteína globular, solúvel que polimeriza formando polímeros de F-actina, insolúveis (Faulkner, 2001). No sarcómero, a F-actina forma filamentos finos que são funcionalmente e estruturalmente polarizados (Faulkner, 2001).

No genoma humano, encontram-se presentes cerca de 20 genes de actina, quatro dos quais encontrados nos músculos cardíaco, esquelético e liso (Klabunde, 2004). A α -actina é a isoforma da actina predominante, sendo o maior constituinte do sarcómero cardíaco. O domínio N-terminal (NH₂-terminal) da α -actina é o local de interação com a miosina, enquanto o domínio C-terminal (COOH-terminal) é onde a α -actina se liga à distrofina

(Fatkin e Graham, 2002). As actinas sarcoméricas, cardíaca e a esquelética são conhecidas por se co-expressarem no miocárdio (Morimoto, 2008).

O gene *ACTC1*, localizado no cromossoma 15q11-q14, codifica para a proteína α -actina cardíaca, tendo sido o primeiro gene associado tanto à MH como à MD (Monserrat, 2007). Este gene tem 6 exões que codificam para uma proteína com 375 aminoácidos, que apesar de ser um dos genes mais importantes para a contração muscular, é um dos que menos contribui para o aparecimento de MH (Morimoto, 2008).

Já foram identificadas 18 mutações associadas a este gene, provocando uma diminuição da estabilidade térmica do monómero da actina, prejudicando a formação do filamento de F-actina (HGMD® <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=ACTC1> acedido a 08 de Dezembro de 2011; Morimoto, 2008). Isto sugere que a incapacidade de formar os miofilamentos e / ou a acumulação dos seus agregados poderia ser um dos efeitos patológicos destas mutações (Morimoto, 2008). A mutação Glu101Lys (E101K ou E99K), substituição de um Glu por uma Lys, com alteração de uma G por uma A (*CardioGenomics* http://genepath.med.harvard.edu/~seidman/cg3/muts/ACTC_mutations_TOC.html acedido a 27 de Setembro de 2011), provoca uma redução na velocidade de deslizamento e na velocidade média da geração da força, diminuindo a afinidade da actina para a miosina, prejudicando as interações actina - miosina (Morimoto, 2008).

1.5.4. Complexo das troponinas

O complexo das troponinas é heterotrimérico compreendendo três subunidades: uma subunidade com ligação ao cálcio (Ca^{2+}), TnC, codificada pelo gene *TNNC1*, uma subunidade inibitória, TnI, codificada pelo gene *TNNI3* e uma subunidade com ligação à tropomiosina, TnT, codificada pelo gene *TNNT2*. Este complexo encontra-se localizado no filamento fino do sarcómero cardíaco e cada subunidade é responsável por uma determinada função como explicado acima e como se observa na Figura 1.9 (Landstrom, 2008).

Em conjunto, as três subunidades desempenham um papel regulador da contração muscular (Szczesna-Cordary, 2002)

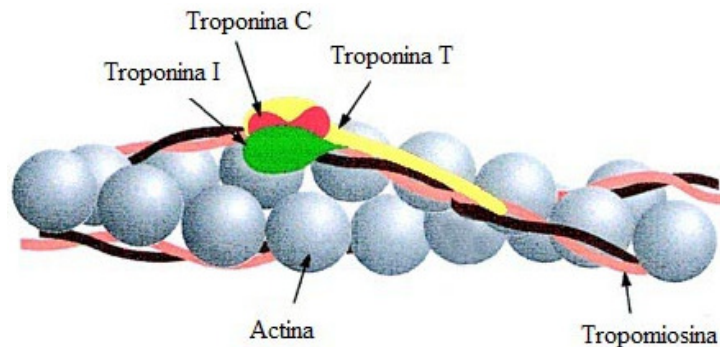


Figura 1.9 – Complexo das Troponinas. Este complexo engloba a troponina T, troponina I e troponina C presentes no filamento fino do sarcómero cardíaco. Cada uma destas três subunidades apresenta funções específicas, como a ligação ao Ca^{2+} pela troponina C, a inibição da interação actina-miosina pela troponina I e a ligação à α -tropomiosina pela troponina T (Adaptado de Gordon, 2000; Landstrom, 2008).

1.5.4.1. Troponina C cardíaca

A Troponina C é uma subunidade do complexo das troponinas com ligação ao cálcio (Ca^{2+}), que interagindo com as restantes subunidades, TnT e TnI, possui um papel central na regulação da contração do músculo cardíaco e esquelético. A ligação do Ca^{2+} à troponina C cardíaca induz alterações na conformação do complexo troponina – α -tropomiosina, inibindo a contração muscular e provocando alterações estruturais nos filamentos finos e grossos (Fatkin e Graham, 2002; Gomes, 2002).

Esta pertence à superfamília de proteínas com ligação ao cálcio e é composta por um domínio globular com extremidades N-terminal e C-terminal, interligadas através de um *linker* flexível (Landstrom, 2008). Cada domínio globular contém dois locais de alta afinidade para o Ca^{2+} na extremidade C-terminal (ligando-se também ao Mg^{2+}). A extremidade N-terminal contém somente um local de ligação ao Ca^{2+} com baixa afinidade, sendo considerada um domínio regulatório, na medida em que a ligação ao cálcio, permite o início do processo de contração muscular (Landstrom, 2008).

O gene *TNNC1*, localizado no cromossoma 3p21.3-p14.3 é composto por 6 exões que codificam para uma proteína de 161 aminoácidos (Landstrom, 2008). Associadas a este gene, existem 13 mutações conhecidas, 4 das quais *missense*, Ala8Val (A8V), Cys84Tyr (C84Y), Glu134Asp (E134D) e Asp145Glu (D145E) (Landstrom, 2008). Estudos funcionais das mutações Ala8Val e Asp145Glu, localizadas em duas regiões funcionais de TnC, demonstraram que o aumento da concentração de Ca^{2+} altera a sensibilidade e recuperação da força, relativas ao mecanismo de contração muscular (Landstrom, 2008). Ao ocorrer a substituição de uma alanina (Ala) para uma Val no codão 8 (substituição de uma citosina por

uma timina C>T), poderão ocorrer alterações no domínio N-terminal da TnC, sendo alterada a afinidade deste domínio para o Ca^{2+} e deste modo produzindo alterações no desenvolvimento da força (HGMD® <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php> acedido a 26 de Setembro de 2011; Landstrom, 2008).

Por outro lado, a substituição de um resíduo de aspartato (Asp) por um Glu no codão 145, devido à alteração de uma C por uma A, pode haver uma diminuição da afinidade do Ca^{2+} / Mg^{2+} para o local de ligação (HGMD® <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php> acedido a 26 de Setembro de 2011; Landstrom, 2008).

1.5.4.2. Troponina I cardíaca

A troponina I cardíaca é a subunidade inibitória do complexo das troponinas, que na presença de baixas concentrações ou mesmo na ausência de Ca^{2+} , reprime a contração muscular devido à inibição da interação entre a actina-miosina num processo mediado pela fosforilação da proteína C cinase. A ligação do Ca^{2+} ao filamento fino é mediada pela proteína cinase A, contribuindo também para a regulação da contração cardíaca (Fatkin e Graham, 2002; Gomes, 2002). A extremidade C-terminal da TnI contém dois locais de ligação ao Ca^{2+} . Sobre condições de activação, a região inibitória da troponina I liga-se ao Ca^{2+} da TnC, permitindo a interação entre a actina e a miosina. Isto sugere que as interações entre a TnI e a TnC desempenham um papel importante, estruturalmente e funcionalmente na regulação da contração (Gomes, 2002).

O gene *TNNI3* localizado no cromossoma 19p13.4 é composto por 8 exões, codificando para uma proteína composta por 210 aminoácidos, sendo esta expressa unicamente no tecido cardíaco (Fatkin e Graham, 2002).

São conhecidas cerca de 57 mutações neste gene, sendo a maioria mutações *missense* (31 mutações), estando localizadas na região inibitória (HGMD® <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=TNNI3> acedido a 08 de Dezembro de 2011). Estudos funcionais demonstraram que a mutação Arg145Gly provoca a redução da inibição do complexo ATPase miosina com o complexo actina – α -tropomiosina, aumentando a sensibilidade do Ca^{2+} (Fatkin e Graham, 2002). Esta redução da inibição é provocada pela substituição de um resíduo de arginina (Agr) por um de glicina (Gly), ocorrendo uma alteração nucleotídica de uma C por uma G, (C>G) (*CardioGenomics* http://genepath.med.harvard.edu/seidman/cg3/muts/TNNI3_Arg145Gly.html acedido a 26 e Setembro de 2011; Morimoto, 2008).

1.5.4.3. Troponina T cardíaca

A troponina T cardíaca (TnT) é expressa desde a formação do coração no desenvolvimento embrionário até à fase adulta, bem como no desenvolvimento do músculo-esquelético. A principal isoforma no coração adulto contém 288 aminoácidos, sendo constituída por 2 domínios: o domínio N-terminal interagindo com a α -tropomiosina e o domínio C-terminal, que se liga à tropomiosina, troponina C cardíaca e troponina I cardíaca (Fatkin e Graham, 2002).

Esta proteína efectua a ligação entre o complexo das troponinas à α -tropomiosina, possuindo um papel central na regulação da contração. Conhecem-se cerca de 63 mutações do tipo *missense*, deleções e mutações de *splicing* no gene *TNNT2*, localizado no cromossoma 1q32, composto por 16 exões, constituindo cerca de 5 a 10% dos casos de MH (CardioGenomics http://genepath.med.harvard.edu/~seidman/cg3/genes/TNNT2_exons.html acedido a 12 de Janeiro de 2012; Ho, 2010).

Mutações neste gene encontram-se associadas a uma hipertrofia cardíaca moderada ou sem significado, apesar de uma elevada incidência de morte súbita sugerir um prognóstico maligno (Morimoto, 2008). As mutações *missense* Arg92Gln (R92Q) e Ile79Asn (I79N) encontram-se localizadas no domínio N-terminal da troponina cardíaca T, apesar de também existirem mutações no domínio C-terminal (Morimoto, 2008). Têm sido realizados alguns estudos de modo a avaliar os aspectos e consequências funcionais de mutações nesta proteína, no sentido de perceber os mecanismos patogénicos moleculares. Miller e colaboradores em 2000 estudaram ratinhos transgénicos que expressavam estas duas mutações, confirmando-se um aumento dos miofilamentos devido à sensibilidade ao Ca^{2+} (Miller, 2001; Morimoto, 2008). Tardiff e colaboradores em 1998, utilizaram também ratinhos transgénicos expressando a mutação Arg92Gln. Ao analisar os miócitos cardíacos, estes investigadores demonstraram um aumento da activação basal do sarcómero, uma deficiência no relaxamento e um menor comprimento, sendo estas observações indicativas para um aumento da sensibilidade ao Ca^{2+} , demonstrando que mutações na troponina T estão envolvidas na patogénese da MH (Morimoto, 2008; Tardiff, 1999).

1.5.5. α -Tropomiosina

A α -tropomiosina pertence a uma família de proteínas com ligação à actina, importantes tanto nas células musculares com nas não musculares. No músculo-esquelético onde foi identificada pela primeira vez em 1948 por Bailey e colaboradores, esta proteína em

conjugação com o complexo de troponinas, desempenha funções na modelação da interação da actina com a miosina durante o processo de contração muscular e na estabilização da estrutura da actina (Figura 1.10) (Bailey, 1948; Wang e Coluccio, 2010; Wolska, 2003).

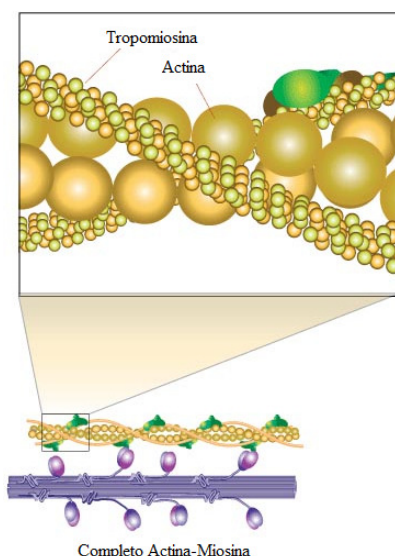


Figura 1.10 – Ligação da α -tropomiosina ao complexo actina – miosina. A α -tropomiosina em conjunto com a troponina (subunidade da troponina T) regula a ligação entre a miosina e a actina (Adaptado de <http://www.sigmaaldrich.com/lifescience/metabolomics/enzymeexplorer/learningcenter/structuralproteins/tropomyosin.html> acessado a 30 de Agosto de 2011).

No músculo estriado, esta proteína é expressa sob a forma de duas isoformas, a α -tropomiosina e a β -tropomiosina, codificadas por diferentes genes. O músculo-esquelético expressa ambas as isoformas, enquanto o músculo cardíaco expressa principalmente a α -tropomiosina (Morimoto, 2008).

O gene *TPM1*, localizado no cromossoma 15q22.1 possui 15 exões com múltiplas isoformas resultantes do *splicing* alternativo, em que 5 dos exões estão presentes em todos os transcritos da α -tropomiosina e os restantes 10 exões encontram-se alternativamente presentes em diversos tecidos. A isoforma cardíaca da α -tropomiosina é composta por 284 aminoácidos (codificados por 10 exões daquele gene). Esta isoforma possui dois locais de ligação para a troponina T cardíaca, um dos quais sensível ao Ca^{2+} e outro menos sensível ao Ca^{2+} (Fatkin e Graham, 2002; Rajan, 2010).

Foram já reportadas 25 mutações associadas à MH (Fatkin e Graham, 2002; HGMD® <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=TPM1> acessado a 08 de Dezembro de 2011). O efeito da sensibilidade do Ca^{2+} durante a contração do músculo cardíaco tem sido frequentemente observado para a maioria das mutações da α -tropomiosina, associados à

troponina cardíaca T e I. Mutações neste gene, são uma causa rara do aparecimento de MH (aproximadamente 5%) (Morimoto, 2008).

A mutação Asp175Asn (D175N) localiza-se no domínio de ligação do Ca^{2+} com a α -tropomiosina. Estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que esta mutação tem como consequência o aumento do nível basal da α -tropomiosina, resultando em alterações estruturais, como a alteração da conformação da proteína e/ou alterações funcionais mediadas pela alteração do local de ligação do das troponinas ou alterando a afinidade para o Ca^{2+} (Fatkin e Graham, 2002; Rajan, 2010; Morimoto, 2008). A baixa regulação endógena da α -tropomiosina sugere que as mutações podem actuar por haploinduficiência (Fatkin e Graham, 2002).

1.6. Proteínas do Disco Z

O disco Z possui um papel fundamental e único na organização do sarcómero cardíaco, na transdução e transmissão da força. É o ponto principal de ancoragem da maquinaria molecular, subjacente ao processo de contração muscular (Faulkner, 2001).

Devido à sua importância na estabilização do mecanismo de acoplamento mecânico do sarcómero, algumas mutações que ocorram nestas proteínas poderão conduzir tanto à MH como à MD (Hayashi, 2004). A complexidade estrutural dos componentes do disco Z é um exemplo extraordinário da arquitectura intrínseca molecular. As proteínas agregadas ao disco Z englobam a titina, a teletonina, a proteína LIM do músculo, a α -actinina, o Cap-Z, a calsarcina-2, miozenina 2, a nebulina e o nebulite, entre outras (Figura 1.11) (Faulkner, 2001).

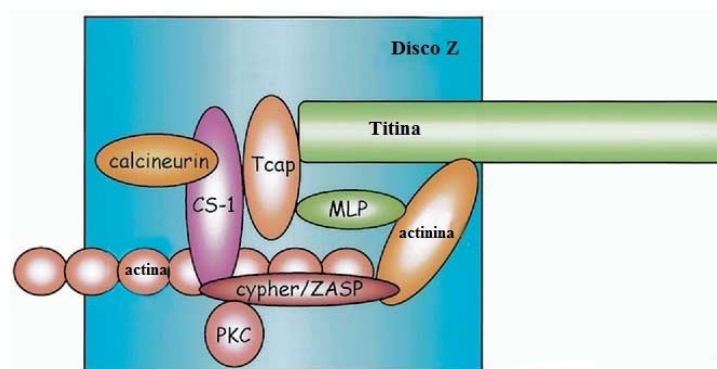


Figura 1.11 – Esquema representativo das proteínas do disco Z. As proteínas do disco Z representadas são a titina (*TTN*), a teletonina (*TCAP*), a proteína LIM do músculo (*CSRP3*), a α -actinina (*ACTN2*), a calsarcina-1 (*CS-1*) e a proteína cinase C (*PKC*) (Adaptado de Hayashi, 2004).

1.6.1. Titina

A titina (*TTN*) é a terceira proteína mais abundante do sarcômero cardíaco, após a miosina e da actina (Hein e Person, 2000). É uma proteína de grandes dimensões, com cerca de 3,0 a 3,7 kDa, sendo o maior polipéptido conhecido e compreendendo cerca de 10% do músculo estriado dos vertebrados (Fatkin e Graham, 2002).

Uma única molécula abrange metade da estrutura do sarcômero cardíaco, desde o disco Z até à linha M, em que 6 filamentos da titina preenchem metade do filamento grosso, como se pode observar na Figura 1.12. Os filamentos de titina encontram-se ancorados ao disco Z através da ligação da extremidade C-terminal da α -actinina (a extremidade N-terminal liga-se à actina) na banda M pela miomesina e ao longo do filamento grosso pela MyBP-C (Figura 1.12) (Hein e Person, 2000).

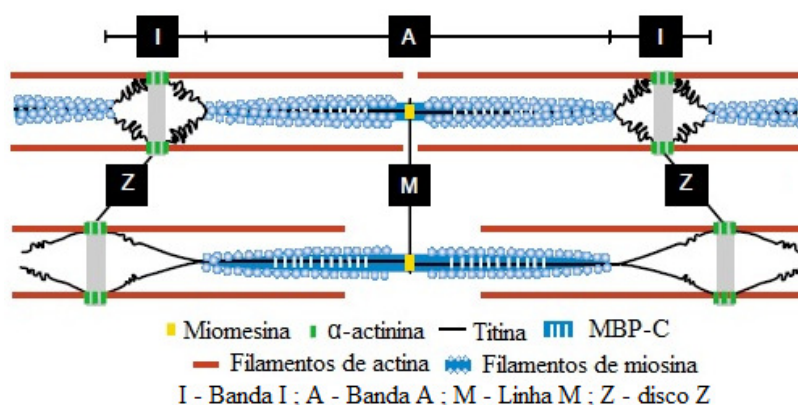


Figura 1.12 – Esquema representativo da estrutura do sarcômero cardíaco com a localização da titina, α -actinina e miomesina evidenciadas. Estas três proteínas pertencem a uma família de proteínas sarcoméricas, presentes no citoesqueleto (Adaptado de Hein e Person, 2000).

A titina é responsável pela estabilização dos filamentos de miosina e pela manutenção da integridade estrutural de todo o sarcômero, actuando como um suporte (Hein e Person, 2000). A proteína titina é codificada por um único gene *TTN*, localizado no cromossoma 2q31 e que contém 363 exões, que codificam para uma proteína com 38 aminoácidos (Bang, 2001). Estão descritas cerca de 30 mutações associadas com este gene (HGMD® <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=TTN> acedido a 08 de Dezembro de 2011). A mutação Arg749Leu (R740L) provoca o aumento da afinidade da titina com a α -actinina, devido à substituição do resíduo de Arg por leucina (Leu), ocorrendo a alteração de uma G por uma T (G > T) (Hayashi, 2004; HGMD® <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php> acedido a 27 de Setembro de 2011; Morimoto, 2008). A titina interage ainda com outro

componente do disco Z, a proteína telotonina (*TCAP*) formando o complexo titina - telotonina (Morimoto, 2008).

1.6.2. Proteína LIM do músculo cardíaco

A proteína LIM do músculo cardíaco (MLP) pertence a uma sub-família de proteínas ricas em cisteína (CRP), sendo a única proteína que partilha duas propriedades, estrutural e funcional. Estas proteínas são constituídas por dois domínios LIM, definidos por uma única estrutura dupla de *zinc fingers* (dedos de zinco) (Geier, 2003). O primeiro dos dois domínios LIM interage com a α -actinina, um componente do disco Z, enquanto o segundo domínio interage com os filamentos de actina e espectrina (Fatkin e Graham, 2002).

Esta proteína tem sido descrita com uma proteína do citoesqueleto, encontrando-se associada a estruturas sarcoméricas, actuando como uma proteína de ligação à superfície (Geier, 2003; Geier, 2008).

A proteína LIM do músculo encontra-se presente no músculo embrionário, sendo um importante promotor da miogénese, actuando também na montagem das proteínas de actina na base do citoesqueleto (Fatkin e Graham, 2002; Geier, 2003).

Mutações no gene *CSRP3* (localizado no cromossoma 11p15.1 e contendo 4 exões), que codifica para a proteína LIM do músculo cardíaco (com 194 aminoácidos), têm sido associadas tanto a casos de MH como de MD (Geier, 2008); tendo sido já descritas 14 mutações neste gene (Fatkin e Graham, 2002; HGMD® <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=CSRP3> acedido a 08 de Dezembro de 2011).

1.6.3. Teletonina

A telotonina é uma proteína sarcomérica com 19 kD, possivelmente localizada no disco Z, estando presente em ambos os músculos, esquelético e cardíaco (Vainzof, 2002).

Esta proteína interage com outras três proteínas do disco Z, a titina, a proteína LIM do músculo e a *FATZ* (γ -filamina, α -actinina e proteína telotonina ligada ao disco Z). A telotonina liga-se à região N-terminal da titina, sendo esta ligação extremamente específica (Faulkner, 2001). É necessária à génese do sarcómero no músculo estriado, desempenhando um papel chave na montagem do sarcómero (Hayashi, 2004).

Mutações no gene *TCAP*, localizado no cromossoma 17q12, com 2 exões e que codifica para a proteína telotonina com 167 aminoácidos, são responsáveis pelo fenótipo de

MH, tendo já sido identificadas 15 mutações associadas (Hayashi, 2004; HGMD® <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php> acessado a 27 de Setembro de 2011)

São exemplos as mutações Thr137Ile (T137I), com uma transição de um resíduo de triptofano (Trp) por um resíduo de Ile e a mutação Arg153His, outra transição entre uma Arg e uma His. Estas mutações em pacientes japoneses foram identificadas por Hayashi e seus colaboradores em 2004 (Hayashi, 2004)

1.7. Proteínas envolvidas nas fenocópias de MH

Estudos moleculares realizados em determinados pacientes que apresentavam características clínicas de MH mas com mutações identificadas nos genes não sarcoméricos, conduziram à identificação de outras causas de hipertrofia cardíaca (Arad, 2005). Esta hipertrofia é causada por mutações nos genes *PRKAG2*, codificado para a proteína $\gamma 2$ subunidade regulatória da AMP (adenosina monofosfato) cinase e no gene *LAMP2* codificado para a proteína membrana associada ao lisossoma (Ho, 2010).

Mutações no gene *PRKAG2* provocam hipertrofia nos miócitos e devido à acumulação de glicogénio (amilopectina) nos vacúolos simulando a condição de MH. AO contrário da MH, não se consegue no entanto, observar um desarranjo dos miócitos e nem fibrose intersticial, como se pode observar na Figura 1.13. Este gene também se encontra relacionado com o Síndrome de *Wolff-Parkinson-White*. Por outro lado, mutações no gene *LAMP2*, podem provocar uma “vacuolização autofágica” do miocárdio, devido à acumulação de produtos não degradados nos vacúolos dos lisossomas (Konno, 2011). Estes vacúolos patogénicos contêm glicogénio ou metabolitos intermediários, que se encontram presentes em outras doenças como a Doença de *Pompe*, de *Danon* e de *Fabri* (Ahmad e Seidman, 2005; Arad, 2005; Bos, 2009; Ho, 2010).

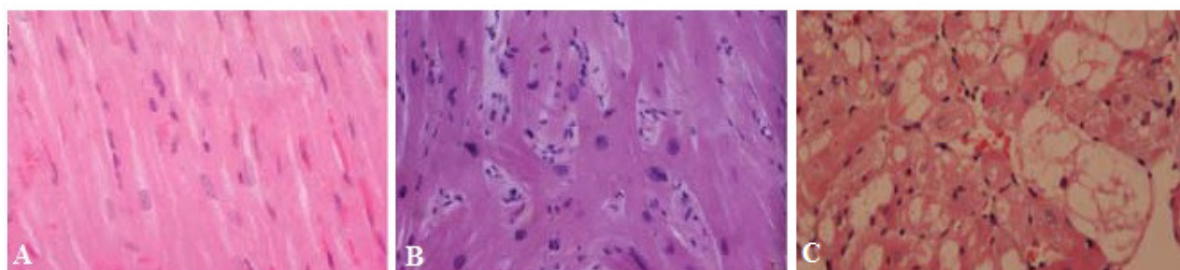


Figura 1.13 – Remodelação histológica da Miocardiopatia Hipertrófica. Comparação histológica entre um tecido miocárdico normal (Figura 1.13A), um tecido miocárdico hipertrofiado, que apresenta uma hipertrofia nos miócitos cardíacos, desarranjo e fibrose intersticial (Figura 1.13B) e um tecido miocárdico com acumulação de glicogénio (Figura 1.13C) devido a mutações no gene *PRKAG2* (Adaptado de Ahmad e Seidman, 2005).

A hipertrofia cardíaca associada com defeitos electrofisiológicos pode indicar mutações no gene *LAMP2*, que codifica para uma proteína membrana lisossomal. Reconhecida inicialmente no contexto da doença de *Danon*, ligada ao cromossoma X, mutações neste gene causam hipertrofia e miopatia esquelética, apresentando características hepáticas e neurológicas. Estudos recentes indicam que mutações neste gene provocam o aparecimento de doença cardíaca com manifestações clínicas leves (Ahmad e Seidman, 2005).

Os mecanismos pelos quais, mutações nestas proteínas lisossomais provocam hipertrofia e disfunções electrofisiológicas, ainda não se encontram totalmente estabelecidos e compreendidos. Apesar de se saber que a acumulação de glicogénio contribui em parte para a hipertrofia cardíaca, alterações mais gerais no metabolismo do miocárdio também são susceptíveis de ocorrer (Ahmad e Seidman, 2005).

1.7.1. Subunidade γ_2 regulatória da proteína AMP cinase

A proteína AMPK é uma proteína heterodínâmica composta por uma subunidade catalítica (α) e duas subunidades regulatórias (β e γ). A subunidade γ possui três isoformas, γ_1 , γ_2 e γ_3 , que variam no tamanho e expressão no tecido. Esta proteína actua como um sensor de metabolitos da proteína cinase, sendo activada sob condições de falta de energia, manifestando-se por um aumento celular dos níveis de AMP (Ahmad, 2005; Fatkin e Graham, 2002).

A AMPK tem a capacidade de fosforilar mais de 15 proteínas alvo, actuando na regulação do metabolismo da energia ao modular uma variedade de actividades metabólicas. Estas actividades incluem o transporte da glucose, a estimulação da β -oxidação dos ácidos gordos, a inativação da síntese do colesterol, a inibição da creatina cinase e a regulação transcricional de diversos genes (Ahmad, 2005).

Mutações no gene *PRKAG2* (conhecidas 15 mutações) localizado no cromossoma 7q36.1, com 16 exões que codifica para a subunidade γ_2 com 569 aminiácidos, não se encontram associadas a alterações na histologia dos miócitos cardíacos, características das mutações em genes sarcoméricos, mas sim com a acumulação de grânulos de glicogénio (amilopectina) em vacúolos nos miócitos (Ahmad, 2005; Gollob, 2001). Devido à expressão da subunidade γ_2 ser especificamente cardíaca, não ocorrem manifestações extra-cardíacas por mutações ocorridas neste gene, distinguindo assim este tipo de outros tipos de doenças de armazenamento de glicogénio (Ahmad e Seidman, 2005; HGMD[®] <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=PRKAG2> acedido a 06 de Setembro de 2012).

Já foram identificados dois transcritos associados a este gene, um transcrito longo (*PRKAG2b*) e um transcrito curto (*PRKAG2a*). O transcrito longo com 16 exões codifica para uma proteína com 569 aminoácidos, enquanto o transcrito curto possui 12 exões e codifica para proteínas específicas do tecido de 352 e 328 aminoácidos (Fatkin e Graham, 2002).

1.7.2. Proteína membrana associada ao lisossoma

As glicoproteínas membranares associadas ao lisossoma pertencem a uma família de proteínas integrais específicas deste organelo. Estruturalmente, as proteínas LAMP dividem-se em dois domínios homólogos, separados por regiões ricas em prolina, em que na extremidade C-terminal, existe uma região transmembrana, seguida por uma cauda muito curta citoplasmática. Em cada um dos domínios, existem duas pontes de dissulfeto conservadas (Saftig, 2005).

A proteína membrana associada ao lisossoma expressa duas isoformas, a e b, que por *splicing* alternativo, originam duas isoformas específicas, LAMP-2a e LAMP-2b, respectivamente. A isoforma LAMP-2a é distribuída uniformemente, enquanto a isoforma LAMP-2b é expressa predominantemente no músculo-esquelético e no cérebro (Fanin, 2006).

Estas duas proteínas são altamente glicosiladas, partilhando 37% de homologia ao nível da sequência, peso molecular e constituem uma fracção significativa do total das proteínas lisossomais (Fanin, 2006). Esta proteína membrana encontra-se envolvida em dois processos, a fusão dos lisossomas com outras membranas e na maturação dos vacúolos autofágicos, actuando também como um receptor das proteínas importadas e degradadas dentro do lisossoma (Konno, 2011). A histopatologia deste tipo de miocardiopatia resulta na acumulação de produtos celulares não degradados em vacúolos autofágicos (Konno, 2011).

Encontra-se associada com a MH apenas 1 mutação no gene *LAMP2*, localizado no cromossoma Xq24, com 10 exões (codificando para uma proteína com 410 aminoácidos), provocando uma hipertrofia precoce e massivamente do ventrículo esquerdo em indivíduos do sexo masculino, bem como arritmias ventriculares profundas e uma rápida progressão para a insuficiência cardíaca (HGMD® <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=LAMP2> acedido a 06 de Setembro de 2012; Konno, 2011)

1.8.Mutações associadas à miocardiopatia hipertrófica: seu impacto no estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo

A identificação de mutações em pacientes com MH tem sido fundamental para o conhecimento da complexidade molecular e da etiologia desta patologia (Ho, 2010). A maioria das mutações patológicas são única, afectando indivíduos dentro de uma família ou de várias famílias (Morita, 2010). A história familiar está presente aproximadamente em dois terços dos casos, sendo a restante fração causada por mutações *de novo*, apresentando-se como casos esporádicos da doença (Marian, 2002)

O modo como as mutações causadoras de MH conduzem à expressão da doença ainda não se encontra totalmente esclarecido. Ao longo dos tempos, várias teorias tem sido estudadas contudo só duas delas prevaleceram (Sorajja, 2000). A maioria destas mutações, consistem em mutações *missense*, raramente levando à perda da função na proteína produzida. Segundo a teoria do polipéptido tóxico, esta proteína é incorporada em conjunto com a proteína normal no sarcómero, onde o seu efeito dominante negativo pode levar a uma alteração da função do sarcómero (Alcalai, 2008; Sorajja, 2000). A maior parte das mutações associadas a MH, têm tudo como mecanismo explicativo a teórica acima referida, com excepção de proteínas truncadas, nomeadamente no gene *MYBPC3* (Flashman, 2004).

A teoria da haploinsuficiência é a segunda teoria que tem demonstrado que as proteínas alteradas produzidas são rapidamente degradadas, não sendo incorporadas no sarcómero (Flashman, 2004). Dado que uma proteína sarcomérica é produzida em exclusivo a partir do alelo normal, é criado um desequilíbrio estequiométrico dos componentes dos filamentos, sendo suficiente para alterar a estrutura e função do sarcómero, inactivando um dos alelos, o que resulta numa redução da quantidade da proteína funcional (Alcalai, 2008; Alcalai, 2008; Seidman e Seidman, 2001; Sorajja, 2000).

Estudos recentes comprovaram a importância de mutações fundadoras em indivíduos com MH (Christiaans, 2010; Dhandapany, 2009). Estas são transmitidas de geração em geração, sendo esperadas em populações geneticamente homogêneas, devido a isolamento geográfico ou social. Estas mutações ocorrem maioritariamente no gene *MYBPC3*, codificando normalmente para o aparecimento de uma proteína truncada, possuindo efeitos menos maléficos que as restantes mutações associadas a MH (Seidman e Seidman, 2011)

O contraste entre a heterogeneidade genética e as mutações fundadoras na MH, oferecem uma nova abordagem para a avaliação da correlação genótipo – fenótipo. As

mutações fundadoras possuem um menor impacto adverso sobre a fisiologia cardíaca, sendo associadas a um melhor prognóstico que as restantes mutações (Seidman e Seidman, 2011).

As mutações causais são suficientes para induzir uma hipertrofia cardíaca numa doença monogénica, sendo o determinante mais relevante na severidade do fenótipo de MH. A maioria das mutações no gene *MYH7* estão associadas com o aparecimento precoce da doença, provocando uma hipertrofia cardíaca severa, enquanto mutações no gene *MYBPC3* provocam o aparecimento da doença já numa fase mais tardia da vida e com uma menor severidade de hipertrofia cardíaca (Marian, 2008). Por outro lado, mutações nos componentes do filamento fino, em particular nos genes *TNNT2* e *TNNI3* estão associadas a um fenótipo de hipertrofia leve. No entanto, é necessário ter em conta a variabilidade da expressão da hipertrofia cardíaca, mesmo em indivíduos com mutações causais idênticas (Marian, 2008).

Apesar da heterogeneidade clínica observada na MH ser em grande parte fruto da heterogeneidade genética (quer de *locus* quer alélica), a variação do genótipo não é por si só suficiente para fazer variar as características clínicas. Nos EUA, por exemplo apesar de cada família apresentar a sua própria mutação, existe no entanto, uma grande diversidade no grau dos sintomas, idade de aparecimento da doença, extensão e localização da hipertrofia do ventrículo esquerdo e até mesmo o risco de morte súbita entre membros dessa mesma família. Igualmente o facto de, na maioria das vezes, estas mutações ditas “privadas” não serem recorrentes noutros indivíduos que não pertençam a essa família torna muito complexo o estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo em MH (Ho, 2010).

Sabe-se que a variabilidade na expressão fenotípica da MH é devida a múltiplos factores, que incluem não só a heterogeneidade dos genes causais e respectivas mutações, presença de múltiplas variantes das proteínas sarcoméricas, genes modificadores, factores epigenéticos, microRNAs e modificações pós-traducionais nas proteínas (Marian, 2010). Em contraste, com os genes causais, os genes modificadores não são suficientes para provocar o fenótipo de MH, mas influenciam a expressão fenotípica desta, como o grau de hipertrofia cardíaca (Marian, 2002; Marian, 2008). A presença de genes modificadores foi evidenciada pela identificação de mutações causais em famílias com MH, que apresentavam um grau de variabilidade clínica considerável entre os membros da mesma família. Um dos genes conhecidos como sendo um dos potenciais genes modificadores de MH é o gene *ACE1* que codifica para a enzima conversora de angiotensina-1 (Marian, 2008). A proteína codificada por este gene tem a função de converter a angiotensina I em angiotensina II, pela libertação do terminal His-Leu do péptido inactivo angiotensina I, resultando um aumento da actividade

vasoconstritora da angiotensina II e a um maior risco de morte súbita em associação a outras mutações causais de MH (*GeneCards*[®] <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACE> acessado a 30 de Setembro de 2011; Marian, 2002).

Recentemente foi reportado que aproximadamente 5% dos pacientes com MH, são portadores de mais que uma mutação em genes distintos ou mesmo dentro do mesmo gene - heterozigótico duplo ou heterozigóticos compostos, respectivamente (Ho, 2010; Ingles, 2005). Estes pacientes podem desenvolver um fenótipo clínico mais severo devido a uma dose dupla da mutação num gene em específico (Ho, 2010; Ingles, 2005; Girolami, 2010). Os pacientes que são homozigóticos (mutação idêntica presente em ambos os alelos de um gene específico) para uma mutação ou heterozigóticos (mutação que afecta somente um dos alelos de um gene específico) para uma mutação composta, apresentam uma hipertrofia mais acentuada e um pior prognóstico que os pacientes que possuem somente um alelo afectado e um alelo normal (Ahmad e Seidman, 2005).

Para além destes factores genéticos e epigenéticos, os factores ambientais, que incluem a dieta, o estilo de vida e a prática de exercício físico, contribuem igualmente para a variabilidade fenotípica observada na MH. No entanto, até ao momento, não existe nenhum estudo concreto que tenha analisado estes factores, relacionando-os de forma directa com o aparecimento do fenótipo de MH.

A prática de exercício físico em indivíduos com MH tem recebido especial atenção, nomeadamente em atletas de alta competição, dado que alguns destes podem desenvolver uma hipertrofia do ventrículo esquerdo substancial, como parte da adaptação fisiológica ao exercício intenso, podendo em alguns casos regredir, caso estes parem o treino intensivo (hipertrofia não patológica) (Alcalai, 2008; Basavarajaiah, 2007; Maron, 2006).

2. Diagnóstico clínico de MH

Quando o diagnóstico de HVE é estabelecido num indivíduo sem outras doenças sistémicas, a abordagem a seguir pode ajudar a determinar se se trata de um caso hereditário de MH ou se é provocado por uma mutação *de novo*. Esta abordagem é bastante importante, dado que um indivíduo com MH pode permanecer assintomático durante anos (Cirino e Ho, 2009)

Assim na primeira consulta do caso índice de MH, deve ser obtida uma história familiar detalhada, de três a quatro gerações, com o objectivo de avaliar a possibilidade de se estar perante um caso familiar, ou seja, de uma MH Familiar ou de um caso esporádico. Na

elaboração da história familiar (*pedigree*), é necessário ter em conta a existência ou não de determinadas ocorrências, tais como, insuficiência cardíaca, MH, transplante cardíaco, morte súbita sem qualquer explicação, qualquer doença cardíaca ou arritmia, acidente vascular cerebral ou doença trombo-embólica (Cirino e Ho, 2009).

Devido à idade variável de aparecimento da doença e à sua baixa penetrância em algumas famílias, é recomendado o seguimento do indivíduo em causa e dos seus familiares, de 5 em 5 anos caso o indivíduo seja um adulto, ou anualmente caso tenha entre 12 e 18 anos de idade através de um ecocardiograma (Prinz, 2011; Cirino e Ho, 2009).

Se se estiver perante um acaso de MH, o médico recomenda a realização de exames complementares de diagnóstico, análises bioquímicas, electrocardiograma (ECG) e ecocardiograma bidimensional (EEG). Enquanto o EEG é uma técnica de imagiologia não invasiva, que revela a extensão e a distribuição da hipertrofia, delineando também as funções contrácteis cardíacas (Seidman e Seidman, 2001), o EEG permite a observação de alguma alteração na forma da hipertrofia do ventrículo esquerdo, entre 75 a 95 % dos pacientes da com MH (Prinz, 2011). A espessura da parede do septo ventricular, bem como a massa muscular ventricular podem ainda ser determinadas pela Ressonância Magnética Cardíaca (RMC) por contraste com gadolínio, ferramenta que se tem tornado de extrema importância para a avaliação clínica de doenças cardíacas (Prinz, 2011). Para complementar o diagnóstico clínico, o médico irá recomendar um diagnóstico molecular aos principais genes causadores de MH.

2.1.Diagnóstico Molecular na MH

O progresso recente na área da genética molecular tem contribuído para a compreensão de muitas das doenças cardíacas (Ho, 2010; Marian, 2010; Prinz, 2011).

Desde a descoberta da primeira mutação causal na MH em 1989 (Jarcho, 1989), que se tem observado um crescente número de genes envolvidos nesta patologia. No entanto, na última década, o aparecimento de novas tecnologias de análise genética de larga escala e de ferramentas bioinformáticas associadas permitiram olhar de forma diferente para o Genoma Humano entrando numa nova era molecular, que culminou com a identificação de mais de 30 genes causais de MH e muitas centenas de mutações. Estas descobertas tem aumentando o interesse no diagnóstico genético, estratificação de risco e no tratamento (Marian, 2010; Santos, 2011 (submetido BMC Medical Genetics)). Apesar dos avanços nas tecnologias de sequenciação que permitem cada vez mais sequenciar rapidamente exomas de genes

associados a MH, esta tecnologia ainda tem tempos e custos elevados (Arad, 2002; Marian, 2010; Santos, 2011).

Após a identificação de uma dada mutação associada a MH no caso índice, os familiares em primeiro grau e descendentes desse indivíduo devem realizar o estudo genético, pelo facto de terem 50% de probabilidade de herdarem a mutação (ões) causal (ais) desta patologia. Caso o diagnóstico molecular ainda não tenha permitido a identificação de uma mutação associada a MH no caso índice, os descendentes/familiares de 1º grau devem-se ser avaliados por um especialista e realizar os exames de diagnóstico clínico – ECG e/ou EEG. Em particular, os jovens entre os 12 e os 18 anos de idade devem ser examinados anualmente, enquanto os adultos com idade superior a 18 anos, devem ser examinados todos os 5 anos (Ho, 2010; Prinz, 2011)

A utilidade do rastreio genético em associação à monitorização clínica tem revelado a sua importância na identificação, em familiares de doentes com MH, muitas vezes assintomáticos, de uma determinada mutação associada a MH (e previamente identificada no caso índice) ou não permitindo identificar qualquer mutação associada a MH e excluindo a doença nesses indivíduos. Assim, o rastreio genético direccionado pode ser importante, dado que pode conduzir à identificação precoce de uma determinada mutação, podendo fornecer a oportunidade de intervir precocemente na redução do risco de morte súbita (Marian, 2010). Note-se ainda que o risco de ter MH não é completamente nulo, no caso de não se identificar a mutação familiar, devido à probabilidade de ocorrência de uma mutação distinta, não identificada previamente no caso índice.

O diagnóstico molecular de indivíduosportadores de MH torna-se exigente, simultaneamente, por haver um grande número de genes causadores desta patologia e um grande número de mutações (Millat, 2010). Actualmente, a genotipagem de mutações associadas à MH é maioritariamente realizada por SA ou por metodologias de rastreio, tais como, o dHPLC (*Denaturing high-performance liquid chromatography*), SSCP (*single strand conformation polymorphism*) ou por *High Resolution Melting* (HRM) (Marian, 2010; Millat, 2010; Santos, 2011) dos 5 principais genes associado à MH (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* e *MYL2*) (Marian, 2010; Millat, 2010).

Qualquer uma destas tecnologias permite a detecção de alterações genéticas por análise de exões e junções exão-intrão e intrão-exão dos genes acima descritos, permitindo a identificação de mutações em 60 a 80 % dos casos de MH. Ao contrário das técnicas de rastreio SSCP, dHPLC e HRM, que permitem apenas identificar regiões com alterações na

sequência nucleotídica, a SA permite a identificação da alteração em causa, pelo que será sempre utilizada na confirmação das alterações observadas pelas outras metodologias de rastreio (Piva e Mattos, 2008). Para além de analisarem um reduzido número de genes, estas metodologias apenas conseguem identificar mutações em 2/3 dos doentes, ficando os restantes 1/3 por caracterizar. Igualmente o facto de serem metodologias bastante dispendiosas e demoradas torna essencial a implementação de novas metodologias para o diagnóstico da MH (Millat, 2010; Santos, 2011 (submetido BMC Medical Genetics)).

Tecnologias de larga escala como o *iPLEX MassARRAY* (Sequenom[®]) que nos últimos anos, tem vindo a ser aplicado no diagnóstico de inúmeras patologias genéticas, como por exemplo, na deteção de mutações na Hipercolesterolemia Familiar (Wright, 2008), deteção de estirpes do Virus do Papiloma Humano (Söderlund-Strand, 2008), pesquisa de marcadores associados a Diabetes Mellitus (Chakkerla, 2009), são uma mais valia para o estudo e análise de mutações na MH, pois permite detectar simultaneamente um elevado número de mutações em vários doentes num só ensaio, tornando o diagnóstico genético de MH mais rápido e menos dispendioso (Santos, 2011). Com esta metodologia, é possível a análise de todas as mutações identificadas até ao momento como associadas à MH em genes sarcoméricos e não sarcoméricos, permitindo assim, um rastreio completo e direccionado em MH (Allegue, 2010; Bagnall, 2011; Santos, 2011).

Actualmente, ainda não existe nenhuma terapêutica disponível para anular directamente o efeito das mutações nos genes sarcoméricos da MH (Bos, 2009). No entanto, o conhecimento da patogénese molecular da MH, promove o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, de modo a modificar e/ou prevenir o desenvolvimento do seu fenótipo (Ho, 2010). O objectivo do tratamento da MH consiste no alívio dos sintomas, tratamento de determinadas complicações como a fibrilhação atrial e a insuficiência cardíaca e na prevenção da morte súbita cardíaca em indivíduos com elevado risco. No entanto, ainda não foi identificada nenhuma terapia que consiga impedir a expressão da doença em indivíduos com mutações nas proteínas sarcoméricas (Semsarian, 2002) e as opções de tratamento incluem fármacos não específicos e portanto dirigidos a outras doenças cardíacas, cirurgia, e implementação de dispositivos para ajudar no controlo do ritmo cardíaco (Cirino e Ho, 2009).

A terapêutica utilizada mais correntemente consiste no uso de β -bloqueantes, bloqueadores do canal de cálcio e medicamentos antiarrítmicos. O uso de β -bloqueantes é o tratamento principal na MH, improvisando o relaxamento ventricular, aumentando o tempo de

diástole e reduzindo a susceptibilidade das arritmias ventriculares e supra-ventriculares. Em determinadas situações, conseguem impedir ou retardar a progressão da insuficiência cardíaca (Marian, 2010). Os bloqueadores dos canais de cálcio são utilizados para ajudar a aliviar os sintomas, especialmente dores torácicas, podendo também ajudar a diminuir a frequência cardíaca e a pressão arterial. Por fim, os fármacos antiarrítmicos ajudam no controlo do ritmo cardíaco e podem ser usados pelos indivíduos com fibrilhação atrial (Cirino e Ho, 2009).

3. Tecnologia de *iPLEX MassARRAY*

3.1.Fundamento

Cada uma das tecnologias disponíveis para a genotipagem quer de polimorfismos de base única (SNPs) quer de mutações (substituições, pequenas inserções e deleções), oferecem uma combinação única de precisão, escala, rendimento e custo. A plataforma Sequenom[®] *MassARRAY* apresenta várias características atraentes para os utilizadores que desejem uma genotipagem personalizada, precisa e com custos mínimos de instalação. Este ensaio oferece vários níveis de especificidade: o primeiro nível baseia-se na reacção de *polymerase chain reaction* (PCR), no qual se amplificam por PCR *multiplex* as regiões de DNA de interesse, seguido de uma reacção de *iPLEX* para cada fragmento amplificado e que se baseia na extensão de um único nucleótido, correspondente à alteração em estudo (Gabriel, 2009; Sequenom GmbH, Germany). Estes fragmentos são posteriormente incorporados num *chip* e a detecção das suas massas é realizada por espectrometria de massa MALDI-TOF (*matrix-assisted laser Desorption/ionization time-of-flight*) (Oeth, 2005; Sequenom GmbH, Germany;).

Na genotipagem por *iPLEXM massARRAY* existem três passos fundamentais, cruciais para o sucesso da identificação da alteração: a amplificação dos fragmentos de DNA de interesse por PCR *multiplex* numa microplaca de 384 poços (Sequenom[®], 2007), a neutralização dos dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados) não incorporados nos produtos de amplificação pela enzima fosfatase SAP (*shrimp alkaline phosphatase*); esta enzima cliva a fosfatase no terminal 5' dos dNTPs não incorporados, convertendo-os em dNDPs (desoxirribonucleotídeos difosfatados) e posterior reacção de extensão a detectar em cada um dos fragmentos amplificados e que será extendido por adição enzimática de um ddNTP (didesoxirribonucleótido trifosfatado) complementar à alteração (Figura 3.1) (Gabriel, 2009; Sequenom[®], 2007).

Esta reacção vai produzir alelos específicos provenientes dos produtos de extensão com diferentes massas, dependendo da sequência analisada (Sequenom[®], 2007).

No passo seguinte, os produtos resultantes da reacção de *iPLEX* são transferidos para um *SpectroCHIP* por um robô *nanodispenser*, sendo analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF (Sequenom[®], 2007) (Figura 3.1). As moléculas do analito são irradiadas por um laser que provoca a sua ionização, atravessando um tubo de vácuo, sendo analisadas por um detector posicionado na extremidade final do tubo. A separação das moléculas ocorre devido ao seu tempo de voo (TOF), sendo proporcional à massa de cada uma das moléculas individualmente. As moléculas são analisadas e separadas tendo em conta o rácio da sua massa em função da carga (m/z), em que as moléculas com massa inferior possuem um tempo de voo mais curto que as moléculas com massa superior (Gabriel, 2009; Ragoussis, 2006). A principal vantagem deste método é a medição directa de uma propriedade física intrínseca, a massa das moléculas a uma velocidade bastante elevada, cerca de 100 μ s, permitindo também a detecção de moléculas de DNA com um tamanho inferior a 100 pb (em que o tamanho depende da fragmentação das moléculas durante o processo de MALDI) (Ragoussis, 2006). Os genótipos são assim diferenciados e identificados tendo em conta a massa de cada alelo, como se pode observar pela Figura 3.1 (Santos, 2011).

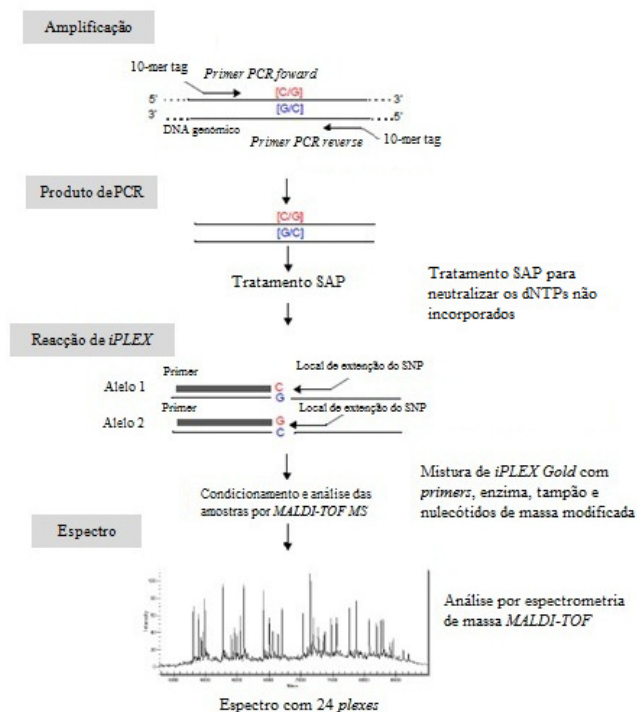


Figura 3.1 – Reacção de *iPLEX MassARRAY*. Esta metodologia é um método utilizado para a detecção de substituições nucleótídicas, pequenas inserções e deleções, no DNA amplificado por PCR *multiplex* e que

engloba três passos fundamentais: a amplificação do DNA, o tratamento SAP e um terceiro passo de extensão (Adaptado de Gabriel, 2009; Oeth, 2005; Sequenom[®], 2007)

A elevada capacidade de automatização desta tecnologia tem permitido a sua aplicação no diagnóstico e com um custo inferior quando comparada com as técnicas correntemente utilizadas para a genotipagem de SNPs (Santos, 2011; Sequenom[®], 2007).

3.2.Desenho de *primers* de *iPLEX MassARRAY*

A preparação de um ensaio tem início com o desenho automático dos *primers* de amplificação e de extensão para as mutações causativas de MH, através do *software MassArray Assay Design 3.1* da Sequenom[®]. Este *software* permite desenhar os *primers* de amplificação e de extensão para cada mutação em estudo, a partir de um fragmento que engloba a mutação flanqueada para cada lado, cerca de 50 a 100 nucleótidos, como se pode observar na Tabela 3.1 (Sequenom[®], 2007).

Tabela 3.1 – Exemplo de sequência utilizada pelo *software MASSARRAY Assay Design 3.1*. (Sequenom[®]) para o desenho dos *primers* de amplificação e de extensão para a mutação CM56 no gene *MYBPC3*. O código CM56 refere-se a uma mutação *missense* no gene *MYBPC3*, no exão 6 (HGMD[®] <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php> cedido a 31 de Janeiro de 2012). Entre parêntesis demarca-se a variante alélica a identificar.

Mutação (gene_códigoHGMD [®])	Sequência
<i>MYBPC3_CM56</i>	GTCTATCTGTTTCGAGCTGCACATCACCGATGCCCAGCCTGCC TTCACCTGGC[A/G]GCTACCGCTGTGAGGTGTCCACCAAGGAC AAATTTGACTGCTCCAACCTCAATCTCACTGTCCACG

Para a identificação de cada mutação em estudo, são necessários dois *primers* de amplificação (que flanqueiam a região a amplificar, como exemplificado na tabela 3.1) e um *primer* de extensão (dirigido especificamente para a mutação). O *software* permite a organização dos *primers* e em consequência das mutações a estudar, em *plexes*, em que cada um dos *plexes* é composto por um conjunto de no máximo de 40 conjuntos de *primers*, correspondendo cada *plex* a um poço da placa de 384 poços e respectivamente a um poço do *Spectrochip* (Figura 3.2) (Santos, 2011).

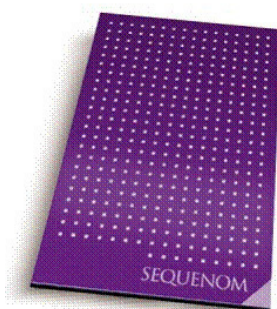


Figura 3.2 – Spectrochip (Sequenom[®], 2007).

Devido à relação inversa entre a intensidade dos picos e a massa do analíto, é recomendado que num ensaio de *iPLEX* a extensão dos *primers* seja ajustada. O *primer* com massa mais elevada, cerca de 8500 Da, possui um pico com uma intensidade inferior a 25% que a média da massa dos *primers* mais baixos. Devido a este facto, a relação entre a razão do SNR (*signal to noise*) e a massa do analíto pode representar um desafio significativo para o *software* de atribuição dos *calls*, podendo ocorrer variações inesperadas na altura dos picos. Neste contexto as reacções de genotipagem bem como a análise dos picos podem ser influenciadas, conduzindo a erros na genotipagem (Sequenom[®], 2007).

Estas variações podem ser causadas pela inconsistência da qualidade dos *primers* e / ou ao mau funcionamento da parte de desorção/ionização do MALDI. As medidas de densidade óptica para avaliar a qualidade dos *primers* não são suficientes, uma vez que os fragmentos provenientes da síntese parcial e outros contaminantes absorvidos, contribuem para uma sobre estimativa da concentração dos *primers* (Sequenom[®], 2007).

Esta estimativa da concentração dos *primers* pode resultar numa baixa intensidade do sinal nos espectros e problemas consequentes na atribuição de *calls*. Para superar esta situação, é recomendado efectuar um teste prévio da mistura dos *primers* antes de se utilizar o MALDI-TOF MS para genotipagem; sendo que a mistura dos *primers* contém cada um dos *primers* à mesma concentração, sendo analisados pela plataforma de *MassARRAY* (Sequenom[®], 2007).

O *Software* de análise *TYPER Analyzer* cria um relatório, designado *Primer Adjustment Report* que identifica a sequência inicial de cada um dos *primers*, de modo a ajustá-los dentro dos *plexes*, recomendando um rácio de ajuste. Dado que existe uma relação inversa entre a massa e o rácio do SNR do analíto, este relatório especifica a massa de cada *primer* a ser ajustado. Em casos extremos, o sinal pode-se tornar indistinguível do barulho, resultando em erros de atribuição de *calls* (Sequenom[®], 2007).

A primeira opção consiste no agrupamento dos *primers* em dois grupos, de menor massa e de maior massa, duplicando-lhes a concentração, como se verifica na Figura 3.3. Esta opção 1, constitui o método mais acessível e fácil de se utilizar, mas pode conduzir a uma percentagem de *calls* relativamente baixa (Sequenom[®], 2007).

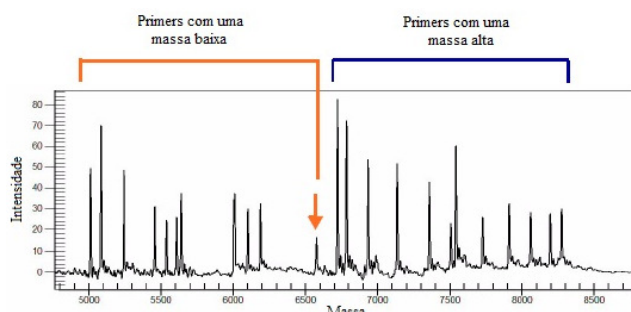


Figura 3.3 – Método de ajuste dos *primers* de extensão, opção 1. Esta opção consiste numa divisão dos *primers* em dois grupos (*primers* com massa baixa e elevada), duplicando-lhes a concentração da massa respectiva (Adaptado de Sequenom[®], 2007).

A segunda opção consiste na distribuição dos *primers* por quatro grupos, duplicando-lhes a concentração e dividindo-os tendo em conta a sua massa (variando de *primers* com menor massa a *primers* com massa mais elevada), como se observa na Figura 3.4. O primeiro grupo de *primers* com massa mais baixa tem uma concentração de 625 nM, o segundo grupo de 830 nM, o terceiro grupo de 1,04 μ M e por fim o grupo de *primers* com a massa mais elevada a 1,25 μ M (Sequenom[®], 2007). Todos os *primers* utilizados neste ensaio foram ajustados tendo em conta esta opção de ajuste.

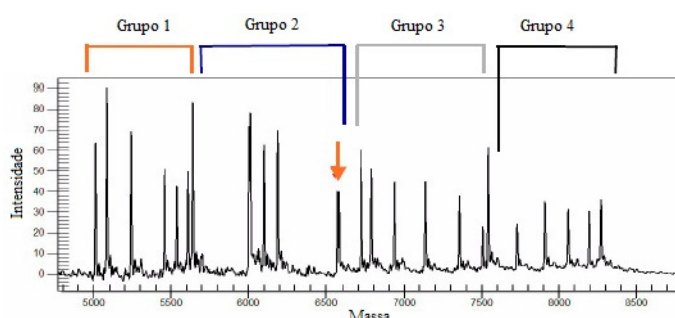


Figura 3.4 – Método de ajuste dos *primers* de extensão, opção 2. Esta opção compreende a divisão dos *primers* em quatro grupos, duplicando a concentração destes, sendo divididos pela respectiva massa (Adaptado de Sequenom[®], 2007).

Por fim a última opção baseia-se no método de regressão, em que cada *primer* é misturado a uma concentração específica de acordo com a sua massa, como se pode observar

na Figura 3.6B. Conhecendo a massa, é possível equilibrar cada *primer* no espectro utilizando as suas concentrações específicas. Esta relação pode ser derivada a partir da equação:

$$Intensidade = -30 \ln(massa) + 2731$$

Esta relação não considera a pureza dos oligonucleótidos e as variações das sequências durante a dessorção/ionização, contudo ainda é utilizada como um bom ponto de começo. Por exemplo para o cálculo da concentração dos oligonucleótidos diluídos, pode-se partir da seguinte fórmula:

$$Concentração\ primer\ na\ mistura = [\ln(massa) - 7,82] \times concentração\ stock\ dos\ primer$$

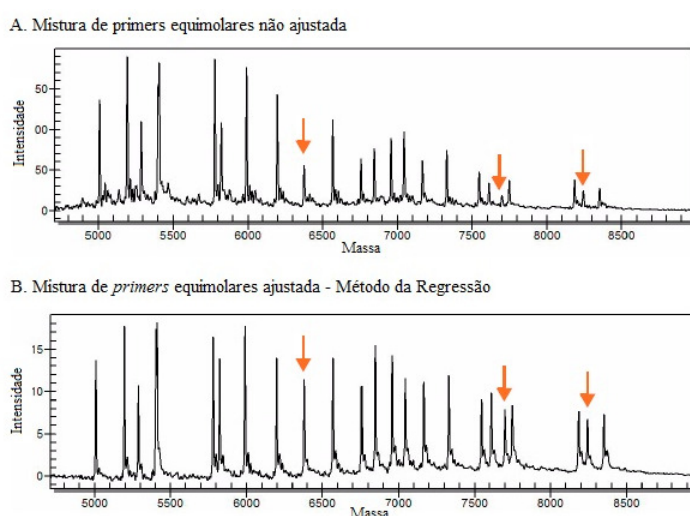


Figura 3.5 – Comparação da concentração não ajustada dos *primers* com a concentração ajustada dos *primers* pelo Método da Regressão, opção 3. Permite ver os efeitos de um bom ajuste de *primers* durante um ensaio de *iPLEX* (Adaptado de Sequenom®, 2007).

Para se obter uma bom ensaio e uma percentagem de *calls* elevada, as opções 2 (divisão dos *primers* em quatro grupos tendo em conta a sua massa) e 3 (método de regressão, tendo em conta a concentração específica de cada *primer*) são mais recomendadas pela Sequenom®.

3.3. Análise dos resultados de genotipagem

Após os dados serem adquiridos e processados, os resultados são armazenados num banco de dados de *MassARRAY*, sendo posteriormente analisados pelo *software Typer 4 Analyser*. A análise pode ser realizada com base no *Traffic Light Pane*, no *Call Cluster Plot* e nos histogramas. O *Traffic Light Pane* permite visualizar a eficiência/performance do ensaio com base num mapa de cores (verde, amarelo e vermelho) atribuído a cada poço do

Spectrochip. A cor do poço é determinada pela comparação do rácio dos valores específicos de *thresholds* (rácio dos *calls* dividido pelo numero total de *calls* (*calls* mais *no calls*) para todos os ensaios no mesmo poço), como se pode verificar pela Figura 3.6 (Sequenom®, 2007).

O *software* atribui uma taxa de *call*, tendo em conta a percentagem de genótipos identificados. Contudo quando não consegue identificar um genótipo devido ao sinal do analíto ser inferior ao ruído de base, atribui a designação de *no call*. O *Traffic Light Pane* demonstra ainda ser uma ferramenta importante para a análise dos resultados de genotipagem, de modo a avaliar a performance do ensaio *multiplex* de cada poço (Sequenom®, 2007).

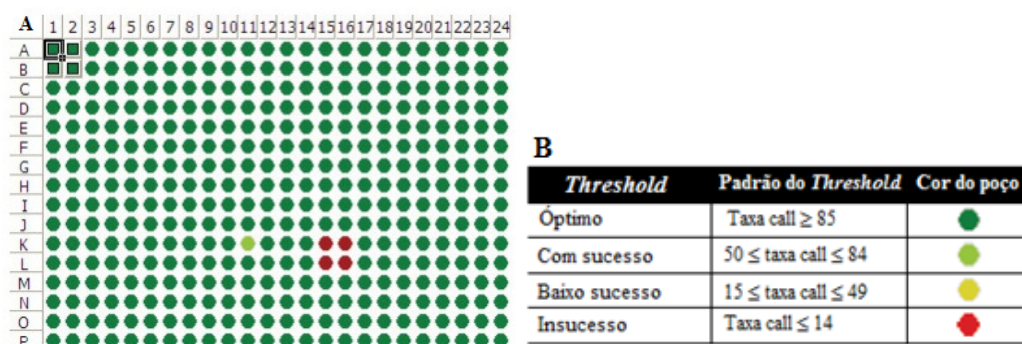


Figura 3.6 – Resultados de genotipagem. A Figura 3.6A representa um exemplo de um *Traffic Light Pane*, enquanto a Figura 3.6B apresenta a distribuição de cores atribuídas a cada um dos poços (Adaptado de Sequenom®, 2007).

Nos casos em que se observa um baixo sucesso na reacção de *iPLEX MassARRAY* com base na análise do *Traffic Light Pane*, pode-se utilizar uma outra ferramenta, designada por *Autocluster*, de forma a melhorar a detecção de alterações em cada poço, como se pode observar pela Figura 3.7. Esta ferramenta é utilizada para gerar o *call cluster plot*, após o processamento dos dados de cada ensaio (Sequenom®, 2007).

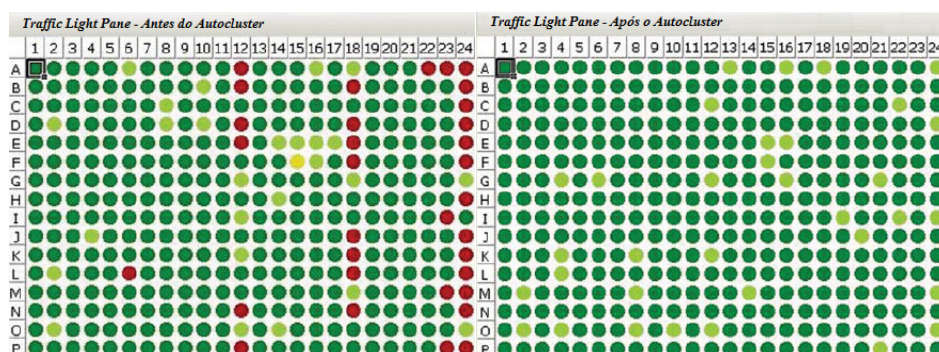


Figura 3.7 – Exemplo de resultados de genotipagem antes e depois do Autocluster. O *Autocluster* ajuda a melhorar o nível de detecção e sensibilidade dos ensaios (Gabriel, 2009).

O *Call Cluster Plot* apresenta-se como um gráfico de dispersão, que ajuda a avaliar a performance do ensaio, informando acerca da altura do pico de massa elevada *versus* a altura do pico de massa mais baixa, bem como o rendimento do ensaio. Dada a altura dos picos dos alelos ou do SNR, o modelo base de genotipagem ideal encontra-se dividido em três regiões: uma região heterozigótica a 45° (graus), duas regiões homozigóticas, uma para os alelos com baixa massa perto do 0° e outra para os alelos com elevada massa nos 90°, como se observa na Figura 3.8 (Sequenom[®], 2007).

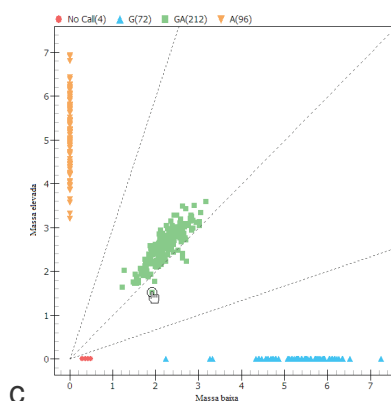


Figura 3.8 – Modelo base de genotipagem. Encontra-se dividido em três regiões: uma heterozigótica a 45° e outras duas homozigóticas, para os alelos de baixa massa a 0° e para alelos de elevada massa a 90° (Adaptado de Sequenom[®], 2007).

Estes ângulos representam os ângulos ideais para os genótipos identificados como *calls*, existindo uma região muito próxima da origem, em que os sinais são considerados demasiado baixos para serem considerados válidos como *call*. Além da taxa de identificação de genótipos como *calls*, também é necessário ter em conta a percentagem de extensão e a área dos picos aquando se analisa resultados de *iPLEX*. A percentagem de extensão consiste na percentagem de conversão dos *primers* tendo em conta o número total de *primers* utilizados no ensaio, enquanto a área do pico é calculada pela área abaixo do pico para todos os alelos específicos. Estes três conceitos estão inter-relacionados de forma complexa (Oeth, 2005; Sequenom[®], 2007).

Tendo em conta estes conceitos, consegue-se retirar informações acerca de possíveis contaminações (classificados como *no call* antes do *Autocluster* e após este como *call*) durante um ensaio, bem como a identificação de prováveis mutações (com um bom nível de extensão, com valores entre 20 a 50), de falsos positivos (nível baixo de extensão, com valores entre 0 e 1), de polimorfismos e também de verdadeiros negativos (apesar de poderem apresentar um bom nível de extensão, quer antes e depois do *Autocluster* são classificados

como *no call*) (Sequenom[®], 2007). Os histogramas apresentados pelo *software* fornecem informação acerca da distribuição dos *calls* para todos os ensaios na totalidade, em que cada uma das barras do histograma representa um ensaio (Sequenom[®], 2007).

Este *software* gera dois relatórios de elevada importância, o *Primer Adjustment Report* (já mencionado anteriormente) e o *Plate Result Report*. O *Primer Adjustment Report* cria um ficheiro que indica como ajustar o volume do *primer* para cada ensaio, atribuindo um *score* de 1 (rácio) ao *primer* com o valor de SNR mais elevado, comparando este valor com os restantes valores dos restantes *primers*. Se o ensaio possuir um *score* inferior a 45%, significa que os *primers* necessitam de ser ajustados, sendo este ajuste também fornecido nestes relatórios. O *Plate Result Report* possui a descrição pormenorizada dos resultados de genotipagem de cada *call* atribuído a um ensaio, segundo uma classificação baseada no genótipo: A) conservativo (elevado grau de confiança); B) moderado (moderado grau de confiança); C) agressivo (grau aceitável baixo de confiança), D) baixa probabilidade (qualidade insuficiente); E) genótipo atribuído pelo operador (a classificação do resultado *call* foi atribuída pelo operador); G) conflito (ensaio com mais que um genótipo possível); H) ensaio mau (erro na definição do ensaio); I) mau espectro (espectro apenas com ruído); J) polimorfismo (ambos os alelos presentes); K) não polimorfismos (um alelo presente); L) baixa frequência (um dos alelos tem uma frequência <0,06% e o erro standard é <2%); M) incertos (a frequência média de um alelo é menor 3 vezes que o erro standard); N) sem alelos (só os *primers* não extendidos e os picos não alélicos é que são observados no espectro) e O) genótipo desconhecido (Sequenom[®], 2007).

4. Objectivo do Trabalho

A MH é a doença genética mais comum e frequente a nível cardíaco, caracterizando-se por uma patologia complexa, com um fenótipo heterogéneo, com uma variedade de manifestações clínicas. O diagnóstico genético é dificultado por se conhecerem cerca de 1000 mutações associadas à MH, em 33 genes distintos, que codificam para proteínas do sarcómero cardíaco. Actualmente para o diagnóstico genético de MH, é utilizada a Sequenciação Automática, normalmente para os genes sarcoméricos *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* e *MYL2*, excluindo à partida todos os outros genes associados a MH.

A utilização de novas metodologias em larga escala para o diagnóstico genético de doenças associadas a múltiplos genes, como o caso da MH, poderá vir a ser promissora, uma vez que, podendo ser automatizada, apresenta um custo inferior quando comparada com as técnicas correntemente utilizadas para o diagnóstico de doenças humanas. A implementação da tecnologia de *iPLEX MassARRAY* é uma mais-valia no estudo e análise de mutações na MH, dado que possui a capacidade de detectar um maior número de mutações num maior número de genes analisados só num ensaio, torna-se menos dispendiosa, mais acessível e menos demorada, de modo a auxiliar o diagnóstico clínico.

Neste contexto, o objectivo deste trabalho experimental baseia-se na optimização da aplicação da tecnologia de *iPLEX MassARRAY* ao diagnóstico de MH. Esta optimização tem por base dois factores cruciais para o sucesso da genotipagem de mutações. O primeiro factor prende-se obrigatoriamente com o desenho dos conjuntos de *primers* e sua organização no *SpectroChip* em reacções *multiplex* (*plexes*). Um segundo factor a ter em conta neste processo de optimização relaciona-se com a integridade das amostras de DNA, dado ser um factor que condiciona a eficiência da reacção de amplificação por PCR e de extensão inerentes à técnica de *iPLEX MassARRAY*.

5. Materiais e Métodos

Os ensaios por *iPLEX MassARRAY* englobam uma série de pontos fundamentais: i) extracção, quantificação e avaliação da integridade do DNA genómico dos indivíduos a estudar, ii) o desenho do ensaio propriamente dito, iii) a amplificação do DNA por PCR iv) o tratamento SAP, v) a reacção de *iPLEX* e por fim vi) a análise por MALDI-TOF (Oeth, 2005 e Sequenom[®], 2007). Todo este procedimento foi realizado tendo em conta o protocolo descrito no *Application Guide* descrito da Sequenom[®].

Os ensaios ii) e vi) foram realizados no Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC) (como Prestação de Serviços).

5.1.Extracção e Quantificação do DNA

Foi extraído DNA a partir de 1 mL de sangue total de 126 indivíduos com MH. Para tal, utilizou-se o kit *DNA Isolation Kit for Mammalian Blood* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), segundo as instruções do fabricante.

Para uma genotipagem eficiente, torna-se necessário a determinação da concentração e integridade das amostras de DNA, que tal como referido, é um factor chave para o sucesso das reacções de amplificação e de extensão de cada *primer*.

O DNA extraído foi posteriormente quantificado por espectrofotometria no UV no NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*, Wilmington, Estados Unidos da América). O cálculo da concentração de DNA foi efectuado utilizando a expressão:

$$\frac{[DNA]_{ng}}{\mu L} = Abs_{260nm} \times \frac{1}{Factor\ de\ Diluição} \times 50 \times 1000$$

A pureza foi calculada pela razão:

$$1,8 \geq \frac{Abs_{260nm}}{Abs_{280nm}} \leq 2$$

Se a razão entre as absorvâncias medidas a 260nm e 280nm, estiver entre 1,8 a 2, este resultado indica que a amostra de DNA encontra-se pura, sem contaminações por parte das proteínas e de RNA, respectivamente, sendo considerada adequada para prosseguir para o ensaio de *iPLEX MassARRAY* (Sequenom[®], 2007).

O DNA foi diluído em água soluções de trabalho para uma concentração final de 10 ng/μL, tal como recomendado pelo fabricante Sequenom[®], 2007. A integridade do DNA foi avaliada a partir de uma electroforese unidimensional em gel de agarose 0,8 % (p/v) durante

60 minutos a 90 V, contendo *GelRed* (Biotarget, representante da Biotium, Portugal; 500 µL de solução 10.000x concentrada) numa concentração de 2 µl por cada 100 mL de gel. O marcador de pesos moleculares utilizado foi o *HyperLadder IV* (Citomed, representante da Bioline, Portugal), concebido para uma fácil quantificação e determinação do tamanho de cada um dos fragmentos. Este apresenta 10 bandas regularmente espaçadas, entre 100 bp a 1000 pb.

5.2. Planificação do Ensaio

Para a planificação de um ensaio de *iPLEXMassARRAY* para a detecção de mutações/polimorfismos no DNA, é necessário ter em conta determinadas directrizes fulcrais, como a escolha das alterações genéticas de interesse, o desenho dos *primers* de amplificação e de extensão, direccionados para a detecção das referidas alterações e ter em atenção algumas considerações específicas do fabricante na reacção de *iPLEX multiplex* (Sequenom[®], 2007). No presente estudo pretendia-se analisar 541 mutações em 33 genes (“*The Human Gene Mutations Database*” (HGMD) do Instituto de Genética Médica de Cardiff (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) e “*Harvard Sarcomere Mutation Database*” (<http://CardioGenomics.med.harvard.edu/home>), descritas como associadas a MH (Secção 1.4, Tabela 1.1).

Para o desenho dos *primers* de amplificação é necessário ter em atenção dois pontos importantes: a dimensão do fragmento (que contém a alteração genética) a amplificar, que deverá estar compreendida entre os 80 e os 120 pares de base (pb), evitando sempre que possível a utilização de fragmentos superiores a 400 pb. Para promover a eficiência e especificidade da detecção da massa de cada fragmento amplificado, é necessário que a massa dos *primers* de amplificação seja diferente da massa dos *primers* de extensão, bem como dos produtos resultantes da amplificação. Como tal, na extremidade 5', os *primers* de amplificação devem incluir uma sequência universal *tag 10-mer* (5'-ACGTTGGATG-3') (Gabriel, 2005; Sequenom[®], 2007).

No desenho dos *primers* de extensão, é necessário ter em conta que o *primer* de extensão hibrida adjacente ao local que possui a alteração genética (mutação ou polimorfismo); que possui entre 15 a 30 nucleótidos (aproximadamente 4500 a 9000 Da); e que deve apresentar uma temperatura de *melting* superior ou igual a 60°C. Todos os *primers* de extensão, bem como os seus produtos de amplificação devem apresentar massas distintas,

de forma a serem posteriormente distinguidos na análise por espectrometria de massa (Sequenom[®], 2007).

Para a obtenção de bons resultados durante a reacção de *iPLEX*, é importante que todos os *primers* de extensão e a massa dos produtos da reacção de extensão difiram em pelo menos 30 Da. Os *primers* para estes ensaios *multiplex* são desenhados pelo *software Assay Design* da Sequenom[®], que verifica e evita combinações de *primers* e de produtos de extensão que possam resultar numa extensão inespecífica. De realçar que é particularmente importante num ensaio *multiplex*, como é o caso, considerar a formação de dímeros de *primer*, evitando a sua formação e a hibridação não específica dos oligonucleótidos (Gabriel, 2005; Sequenom[®], 2007).

5.3. Amplificação de regiões específicas do DNA

5.3.1. Desenho dos *primers* e das placas

Como já foi referido acima, o desenho dos *primers* é um passo importante para o sucesso do ensaio de *iPLEX*, sendo necessário evitar a formação de dímeros de *primers*, bem como possíveis combinações destes e dos produtos de extensão resultantes (Sequenom[®], 2007).

Todos os *primers* foram desenhados de acordo com o *software MassArray Assay Design 3.1* da Sequenom[®]. Este *software* permite desenhar os *primers* de amplificação e de extensão para cada mutação, a partir de um fragmento que contém a mutação flanqueada para cada lado, de cerca de 50 a 100 nucleótidos e aloca-los em *plexes*, garantida uma combinatoria que permita uma detecção específica de cada mutação (Tabela 3.1; Sequenom[®], 2007).

Tendo em conta que, para a detecção de cada mutação são necessários dois *primers* para a reacção de amplificação (pares de *primers*) e 1 *primer* para a reacção de extensão de cada mutação, foram desenhados 1082 *primers* de amplificação e 541 *primers* de extensão, em que ao conjunto dos três se designou por conjunto de *primers*. Este conjunto de *primers* foi alocado em *plexes*, pelo *software MassArray Assay Design 3.1*, podendo em cada *plex* detectar-se até cerca de 40 mutações. Neste sentido as 541 mutações foram distribuídas inicialmente em 21 *plexes*. No decorrer do trabalho a necessidade de optimização dos ensaios levou à redistribuição de alguns *primers* noutros *plexes* e portanto no 2º ensaio as mutações passaram a estar distribuídas por 31 *plexes* e no 3º ensaio em 35 *plexes*.

Antes de se proceder aos ensaios de *iPLEX MassARRAY*, há necessidade de distribuir igualmente as amostras que vão ser estudadas em cada *chip*. Neste sentido as placas foram desenhadas, tendo em conta que os *plexes* se encontram distribuídos por colunas e que as amostras são distribuídas por linhas. Em cada linha é então analisada uma dada amostra (1 μ L de DNA) de um indivíduo com MH, incluindo obrigatoriamente um controlo negativo (linha A; 1 μ L de água bi-destilada). Na Figura 5.1 pode observar-se um exemplo de um dos desenhos da placa correspondente ao Ensaio 2.

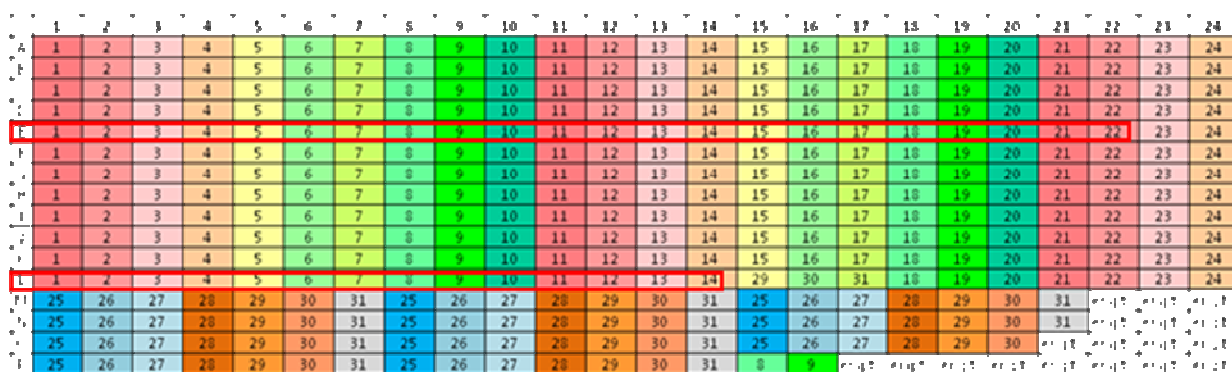


Figura 5.1 – Organização da placa de *iPLEX MassARRAY* com 31 *plexes*.

Apesar de as informações relativas às mutações em estudo terem sido retiradas de duas bases de dados públicas, HGMD e “*Harvard Sarcomere Mutation Database*”, a sua nomenclatura foi alterada no decorrer do trabalho, pois o conjunto das 541 mutações e a sua organização em *plexes*, considera-se *trade secret* da empresa de Diagnóstico Genético DUONAR, Lda.

5.3.2. Preparação da mistura de reacção de amplificação

O primeiro passo desta reacção consistiu na amplificação das regiões específicas de DNA de interesse por PCR, direccionada para a identificação das 541 mutações em 33 genes. Foi preparada uma mistura de reacção por cada *plexes*, contendo a respectiva mistura dos *primers* de amplificação, descrito na Tabela 5.1 pela ordem indicada, sendo os volumes incrementados em 10%, de forma a garantir um volume final correcto, compensando possíveis erros de pipetagem.

Tabela 5.1 – Mistura de reacção do PCR *multiplex* para 384 reacções (Sequenom®, 2007)

Reagentes	Concentração pretendida em 5 µL	Volume (1 reacção)
Água (HPLC)	-	1,9 µL
10x Tampão PCR com 20 mM de MgCl ₂	1x (2 mM MgCl ₂)	0,5 µL
MgCl ₂ (25 mM) *	2 mM	0,4 µL
Mistura de dNTPs (25 mM cada)	500 µM	0,1 µL
Mistura de <i>primers</i> (500 nM cada)	100 nM	1,0 µL
Enzima de PCR (5U/µL)	0,5 U/reacção	0,1 µL
Volume Total		4,0 µL

* A concentração final do MgCl₂ é de 4 mM (2 mM proveniente do tampão e 2 mM do MgCl₂)

Adicionou-se 1 µL de DNA e 4,0 µL da mistura de PCR a cada poço da placa de 384 poços (*Marsh Biomedical Products, Inc. #SP 0401 Sequenon*) e selou-se a placa com um *sealing foil*. A placa foi centrifugada (1000 rpm (rotações por minuto), 1 minuto, 4°C) e colocada no termociclador (*GeneAmp PCR System 9700 da Applied Biosystems®*). O protocolo de PCR utilizado está descrito na Tabela 5.2 (Sequenom®, 2007).

Tabela 5.2 – Condições de reacção de amplificação de DNA por PCR (Sequenom®, 2007)

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	4'	1
94°C	20''	
56°C	30''	45
72°C	1'	
72°C	3'	1
4°	5'	1
15°		

5.4.Tratamento pela enzima *shrimp alkaline phosphatase*

O primeiro passo após a reacção de PCR consistiu no Tratamento SAP, onde os dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados) não incorporados nos produtos de amplificação vão ser neutralizados pela enzima fosfatase alcalina. Esta enzima catalina a hidrólise de um grupo fosfat no terminal 5' dos dNTPs não incorporados, convertendo-os em dNDPs

(desoxirribonucleotídeos difosfatados), fazendo com que estes não interfiram com as reacções seguintes (Sequenom[®], 2007).

A mistura de reacção enzimática SAP foi preparada por adição dos componentes descritos na Tabela 5.3 (por cada reacção), adicionados pela ordem descrita, sendo os volumes incrementados em 10% para compensar possíveis erros de pipetagem. Esta mistura foi centrifugada a 5000 rpm, 10 segundos). A mistura de reacção SAP é distribuída pela última linha de uma placa de 96 poços (*96-well Plate Vee Bottom, Sarstedt, Inc. #82.1283*). Estes poços da linha H são utilizados como reservatório dessa mistura de reacção SAP, sendo a partir destes que a solução será distribuída para os restantes poços da placa de 96 poços (Sequenom[®], 2007). 2 μ L desta mistura foram posteriormente dispensados pelo robot em cada poço da placa de 384, tal como descrito na Figura 5.2.

Tabela 5.3 – Composição da solução enzimática SAP (Sequenom[®], 2007)

Reagentes	Volume (1 reacção)
Água (HPLC)	1,53 μ L
Tampão SAP (10x)	0,17 μ L
Enzima SAP (1,7 U/ μ L)	0,30 μ L
Volume Total	2,00 μ L

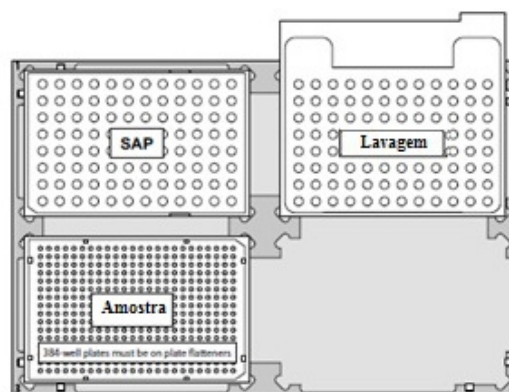


Figura 5.2 – Diagrama representativo do espaço de trabalho. O braço do robot pipeta a mistura de reacção para a placa de 384 poços, a partir da placa de 96 poços, seguindo-se de uma lavagem (Sequenom[®], 2007).

5.4.1. Incubação da Solução Enzimática SAP

Centrifugou-se a placa de 384 poços (1000 rpm, 1 minuto), colocou-se no termociclador e procedeu-se à reacção enzimática SAP, de acordo com o procedimento descrito na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Condições de reacção de amplificação da mistura de reacção SAP (Sequenom[®], 2007)

Temperatura	Tempo	Ciclos
37°C	20'	1
85°C	5'	1
4°C	∞	

5.5.Reacção de *iPLEXGold*

Após a adição da enzima SAP aos produtos de amplificação, o passo seguinte visa uma reacção de extensão de uma base correspondente à mutação em estudo - reacção de *iPLEX*. O ajuste dos *primers* de extensão é um passo importante nesta etapa, preparando-se uma mistura de reacção de *iPLEX* (Sequenom[®], 2007).

5.5.1. Ajuste da Extensão dos *primers*

Para a realização de uma experiência *multiplex*, é recomendado o ajuste da concentração dos *primers* de modo a equilibrar o rácio do SNR. Neste caso, utilizou-se o Método de ajuste dos *primers* de extensão, tendo em conta a opção 2, que compreende a divisão dos *primers* em quatro grupos, duplicando a concentração destes, sendo divididos pela respectiva massa (Sequenom[®], 2007).

5.5.2. Preparação da mistura de reacção

O terceiro passo consistiu na preparação da mistura de reacção de extensão para cada um dos *Plexes*, de acordo com a Tabela 5.5. Os reagentes devem ser adicionados pela ordem indicada, sendo o volume aumentado em 10%, de modo a compensar algum erro de pipetagem (Sequenom[®], 2007).

Numa nova placa de 96 poços (*Sarstedt #82.1583 96-Well Plate Vee Bottom*), dispensou-se a mistura de reacção de *iPLEXGold* manualmente. Quando se pipeta, é necessário garantir que se pipeta para o centro do poço, que nenhuma gota fique agarrada as paredes do poço e verificar da inexistência de bolhas de ar nos poços. Centrifugou-se a placa (1600 rpm, 1 minuto) (Sequenom[®], 2007).

Tabela 5.5 – Composição da mistura de reacção de *iPLEXGold* (Sequenom®, 2007)

Reagentes	Concentração em 9 μ L	Volume (1 reacção)
Água (HPLC)	-	0,619 μ L
Tampão <i>iPLEX</i> Plus (10x)	0,222x	0,200 μ L
Mistura dos terminadores de <i>iPLEX</i>	1x	0,200 μ L
Mistura de <i>primers</i> (8 μ M; 10 μ M; 12 μ M) *	0,84 μ M; 1,04 μ M; 1,25 μ M	0,940 μ L
Enzima do <i>iPLEX</i>	1x	0,041 μ L
Volume Total		2,000 μL

* Ilustra as concentrações em que os *primers* são divididos tendo em conta a sua massa

Colocou-se a placa de 96 poços no espaço de manutenção de líquidos (posição “Mistura”) (Figura 5.3). A placa de 384 poços foi retirada do termociclador, centrifugada (1000 rpm, 1 minuto), removeu-se o *sealing film* da placa e colocou-se na posição “Amostra” do espaço de manipulação de líquidos, como se observa na Figura 5.3. Procedeu-se à adição da mistura de reacção, dispensando 2 μ L desta em cada um dos 384 poços da placa (Sequenom®, 2007).

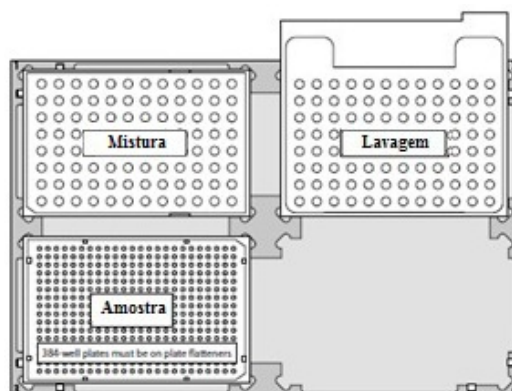


Figura 5.3 – Diagrama representativo do espaço de trabalho. O braço do robot pipeta a mistura de reacção *iPLEXGold* (Sequenom®, 2007).

5.5.3. Amplificação das reacções de extensão

Após a adição da mistura de reacção *iPLEXGold* na placa de 384 poços, o passo seguinte consistiu na amplificação destas por PCR. A placa de 384 poços foi selada e centrifugada (1000 rpm, 1 minuto) e colocada no termociclador. Seguiu-se o protocolo descrito na Tabela 5.6 (Sequenom®, 2007).

Tabela 5.6 – Condições de reacção de amplificação do *iPLEXGold* (Sequenom®, 2007)

Temperatura	Tempo	Ciclos	Ciclos
94°C	30'		
94°C	5''		40
52°C	5''	5	
80°C	5'		
72°C	3'		
4°	∞		

5.6. Limpeza dos produtos de reacção

Após as reacções de *iPLEXGold*, o passo seguinte consistiu na adição de uma resina que remove o excesso de sais. A *SpectroCLEAN* (Sequenom®) é uma resina catiónica pré-tratada com reagentes ácidos, que ao ser adicionada directamente aos produtos de reacção provenientes da extensão, remove os sais de sódio (Na^+), de potássio (K^+) e de magnésio (Mg^{2+}). Se estes iões não forem removidos, os espectros de massa podem vir a apresentar um nível elevado de ruído (Gabriel, 2009; Sequenom®, 2007).

5.6.1. Preparação da placa de resina

Transferiu-se 6 mg de resina para uma placa *dimple* de 384 poços, certificando-se que esta fica bem distribuída e com um volume adequado (Figura 5.4). Durante os 20 minutos de repouso da resina na placa *dimple*, adicionaram-se 25 μL de água aos poços, centrifugando-se a 4000 rpm de modo a obter uma quantidade extra de resina no fundo do poço (Sequenom®, 2007).

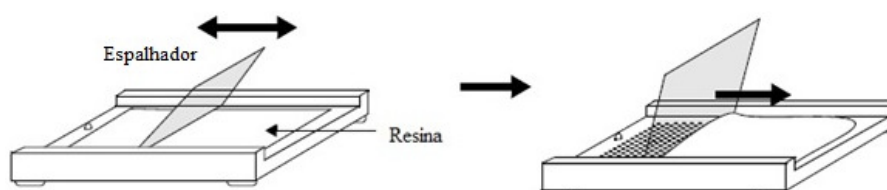


Figura 5.4 – Placa *dimple* de 384 poços (Adaptado de Sequenom[®], 2007).

5.6.2. Adição de água à microplaca

No espaço de manipulação de líquidos, colocou-se um reservatório com água nanopura (80 mL) (Figura 5.5). Centrifugou-se a placa de 384 poços (1000 rpm, 1 minuto), removeu-se o *sealing film* e colocou-se de novo no espaço de manutenção de líquidos do robot, como se observa na Figura 5.5. Após este processo, removeu-se a placa desta posição, verificando se esta se encontra bem selada, centrifugando-se a 1600 rpm durante 30 segundos (Sequenom[®], 2007).

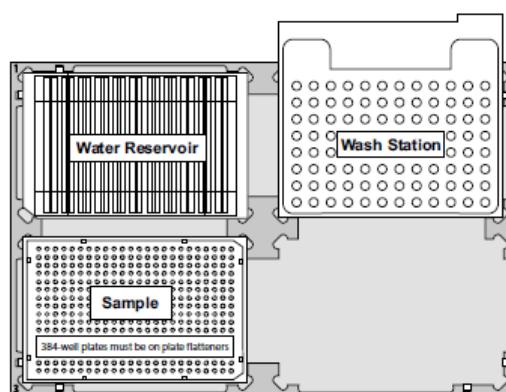


Figura 5.5 – Diagrama representativo do espaço de trabalho. Passo de limpeza dos produtos provenientes da reacção de *iPLELGold* (Adaptado de Sequenom[®], 2007).

5.6.3. Adição de resina às amostras da placa de 384 poços

Para este passo procedeu-se à montagem da placa de 384 poços na placa *dimple*. Colocou-se a placa em cima da placa *dimple*, invertendo-as para que a resina caia sobre os poços da placa, como se observa na Figura 5.6. É importante a inexistência de bolhas de ar nos poços desta antes da sua rotação, mas se existirem é necessário que se realize outra centrifugação (Sequenom[®], 2007).

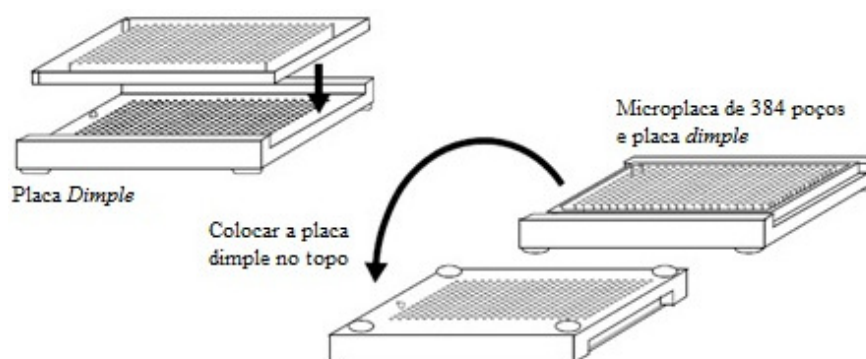


Figura 5.6 – Montagem da placa de 384 poços e da placa *dimple*. Este procedimento é necessário para que a placa de 384 poços fique impregnada com resina e assim proceder ao passo da sua limpeza (Adaptado de Sequenom[®], 2007).

Procedeu-se à rotação da placa a 360° no seu eixo longitudinal, durante cinco minutos à temperatura ambiente (Figura 5.7). Centrifugou-se a placa a 3200 g durante 5 minutos, estando os produtos de reacção *iPLEXGold* preparados para serem transferidos para o *SpectroCHIP*, utilizando o dispensador do *MassARRAY*.

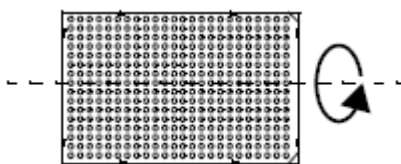


Figura 5.7 – Rotação a 360° da placa de 384 poços (Sequenom[®], 2007).

5.7. Dispensa no *SpectroCHIP* e Espectrometria de massa MALDI-TOF

Utilizou-se o nanodispenser da Sequenom[®] para distribuir os produtos de reacção num *chip* de 384 poços, designado de *SpectroCHIP* (Sequenom[®], 2007).

O *SpectroCHIP* é então colocado no espectrómetro de massa MALDI-TOF, permitindo a determinação das massas correspondentes a cada alelo a ser genotipado. Os resultados são obtidos na forma de *call cluster results* e de gráficos (*call cluster plot*) que serão posteriormente analisados.

6. Resultados e Discussão

De acordo com o plano de trabalho, a optimização dos *primers* de amplificação e de extensão referentes à tecnologia de *iPLEX MassARRAY*, foi realizada tendo por base três ensaios experimentais, designados Ensaios 1, 2 e 3 e compreendendo 16 placas no total. No Ensaio 1 foram testadas 16 amostras de DNA (e uma amostra como controlo negativo) em cada uma das duas placas. No Ensaio 2, foram testadas 11 amostras de DNA (e uma amostra como controlo negativo) em cada uma das 5 placas. No Ensaio 3, foram testadas 10 amostras de DNA (e uma amostra como controlo negativo) em cada uma das 9 placas, perfazendo um total de 126 amostras de DNA (sendo algumas das amostras repetidas). Em todos os ensaios, foram analisadas 541 mutações associadas à MH, estando no entanto distribuídas em 21 *plexes* (Ensaio 1), 31 *plexes* (Ensaio 2) e 35 *plexes* (Ensaio 3). A análise dos resultados desta tese vai desta forma centrar-se nestes 3 ensaios na tentativa de identificar a eficiência do desenho das várias placas, tendo por base, não só a análise da sensibilidade/eficiência dos *primers* de amplificação e dos *primers* de extensão distribuídos pelos diferentes *plexes* de acordo com cada um dos ensaios, mas também a qualidade dos DNAs em estudo. É necessário ter em consideração a forma como se distribuiu os *plexes* e as amostras nas placas: os *plexes* foram distribuídos por colunas e as amostras de DNA por linhas. Todas as 541 mutações em estudo localizam-se em genes que codificam para proteínas sarcoméricas e não sarcoméricas, associadas à MH (Secção 1.4, Tabela 1.1 e Tabela 6.1)

Na Tabela 6.1 encontra-se indicado o número de mutações analisadas para cada um dos genes.

Tabela 6.1 – Tabela indicativa do número de mutações testadas por gene e respectiva % pela tecnologia de *iPLEX MassARRAY*. O gene *MYH7* apresentou uma maior percentagem de mutações a testar, sendo seguido dos genes *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1* e *MYL2*.

Genes	Número mutações	% Mutações
<i>MYBPC3</i>	192	33,2
<i>MYH7</i>	215	37,2
<i>TNNT2</i>	36	6,2
<i>TNNI3</i>	28	4,8
<i>TPM1</i>	13	2,2
<i>ACTC1</i>	8	1,4
<i>MYL2</i>	11	1,9

<i>MYL3</i>	7	1,2
<i>MYO6</i>	2	0,3
<i>CSRP3</i>	7	1,2
<i>TCAP</i>	11	1,9
<i>COX15</i>	2	0,3
<i>PRKAG2</i>	9	1,6
<i>FXN</i>	2	0,3
<i>DES</i>	2	0,3
<i>SCL25A4</i>	2	0,3
<i>MYLK2</i>	4	0,7
<i>JPH2</i>	6	1,0
<i>MTCYB</i>	3	0,5
<i>MTTI</i>	1	0,2
<i>MTTG</i>	1	0,2
<i>TTN</i>	2	0,3
<i>MYOZ2</i>	2	0,3
<i>VLC</i>	1	0,2
<i>LAMP2</i>	1	0,2
<i>CASQ2</i>	1	0,2
<i>MYH6</i>	3	0,5
<i>OBSCN</i>	1	0,2
<i>CAV3</i>	1	0,2
<i>RAF</i>	1	0,2
<i>PLN</i>	1	0,2
<i>TNNC1</i>	2	0,3

6.1. Análise da integridade das amostras

Para a realização deste estudo, foram utilizadas como atrás referido 126 amostras de pacientes com diagnóstico clínico de MH. Para todos os ensaios, utilizou-se como controlo negativo água ultrapura (Roche®), substituindo nas misturas de PCR, o DNA por este reagente. O DNA das 126 amostras foi extraído a partir de sangue periférico, segundo o protocolo apresentado nos materiais e métodos. A concentração e a pureza do DNA foi avaliada por espectrofotometria no UV, cujos resultados estão apresentados na Tabela 6.2.

Tabela 6.2 – Concentração e pureza do DNA extraído a partir de 126 amostras de sangue periférico de doentes com MH.

Amostra	Concentração (ng/uL)	Abs _{260/280}	Amostra	Concentração (ng/uL)	Abs _{260/280}	Amostra	Concentração (ng/uL)	Abs _{260/280}
1	259,5	1,68	43	205,8	1,72	85	30,6	1,69
2	37,9	1,99	44	242,7	1,86	86	17,85	1,65
3	192	1,68	45	1011,1	1,8	87	21,09	1,27
4	30,1	1,68	46	144,7	1,99	88	14,94	1,65
5	22,8	1,68	47	76,2	1,78	89	14,8	1,66
6	20,8	1,89	48	44,78	1,56	90	32,48	1,86
7	26,1	1,93	49	310,5	1,66	91	68,24	1,79
8	58,1	1,78	50	12,4	1,71	92	22,68	1,67
9	17,8	1,66	51	31,3	1,81	93	25,69	1,65
10	81,3	1,72	52	14,7	1,68	94	15,25	1,67
11	10,4	1,65	53	20,4	1,73	95	35,09	1,65
12	76,9	1,65	54	114	1,65	96	12,8	1,71
13	128,1	1,66	55	169,6	1,75	97	47,07	1,68
14	101,8	1,7	56	20,9	1,87	98	38,41	1,74
15	18,8	1,76	57	16,5	1,91	99	17,05	1,65
16	22,4	1,79	58	142,3	1,88	100	19,66	1,65
17	134,8	1,96	59	80,6	1,72	101	40,25	1,71
18	10,4	1,98	60	20,2	1,65	102	24,58	1,76
19	185	1,87	61	18,8	1,65	103	86,51	1,7
20	107,7	1,88	62	61,5	1,73	104	34,27	1,92
21	64,4	1,85	63	16	1,69	105	17,27	1,46
22	27,2	1,96	64	17,2	1,93	106	35,5	1,98
23	62,1	1,74	65	27	1,67	107	44,9	1,72
24	10,9	2,02	66	13,4	1,65	108	16,3	1,98
25	239,7	1,88	67	16,1	1,81	109	55	1,76
26	138,9	1,82	68	28,33	1,78	110	24,9	1,87
27	10,2	1,79	69	29	1,68	111	48,5	1,79
28	116,8	1,59	70	22,3	1,99	112	109,3	1,71
29	31,1	1,73	71	24,6	1,69	113	24,8	1,89
30	17,5	1,72	72	38,7	1,65	114	219,2	1,84
31	30,4	1,92	73	23,7	1,66	115	467,1	1,66
32	30,5	1,93	74	40,6	1,58	116	110,9	1,66
33	23,4	1,97	75	67,2	1,65	117	24	1,67
34	26,9	1,93	76	46,75	1,71	118	25,2	1,85
35	35	1,66	77	113,7	1,71	119	180,7	1,94
36	132,5	1,95	78	171,3	1,68	120	18,9	1,65
37	17,9	1,92	79	46,7	1,73	121	246,3	1,83
38	15,6	1,71	80	20,6	1,67	122	12,4	1,67
39	11	1,64	81	23,8	1,69	123	17,58	1,77
40	13,2	1,67	82	98,1	1,88	124	22,5	1,65

41	125,5	1,69	83	11,9	1,54	125	24,51	1,88
42	29,7	1,73	84	11,3	1,91	126	107,4	1,68

Ao avaliar os resultados da Tabela 6.2 podemos constatar que a maioria das amostras apresentam uma gama de concentração e de pureza que permitem prosseguir o trabalho experimental (Secção 5.2, Capítulo Materiais e Métodos). De ressaltar no entanto, que a amostra 87 apresenta uma razão de absorvâncias A_{260}/A_{280} bastante mais baixa, indicativo de contaminação com proteínas. Este dado será integrado na análise dos resultados.

6.2. Etapas de Optimização

Na optimização das reacções em PCR *multiplex* que fazem parte dos ensaios de *iPLEXMassARRAY*, o processo foi realizado a duas fases: verificar se todos os fragmentos foram amplificados no PCR *multiplex* e se posteriormente houve reacção de extensão do 3º *primer* para todos os amplicões. Para tal, foi necessária uma análise bioinformática extensa ao *software TYPER Analyzer 4.0* da Sequenom®, sendo especificamente usadas as ferramentas *Primer Adjustment Report*, o *Plate Result Report*, o *Traffic Light Pane*, o *Autocluster* e o *call cluster plot*.

Na análise dos *primers* de extensão usou-se os valores de *signal-to-noise* (SNR) destes *primers*. O *software* atribui o valor de 1 para o *primer* com o maior valor de SNR num poço. Todos os *primers* nesse poço que obtiverem um valor de SNR 45% inferior ao do *primer* com maior SNR deverão ser revistos, pois a sua concentração não será adequada à realização do ensaio *multiplex*, podendo originar *no calls*. Nestes casos, o *software* indica-nos a % (como uma fracção do volume original adicionado) de *primer* que deverá ser de novo adicionado à mistura original. Idealmente num *plex*, todos os *primers* deveriam ter valores de SNR equivalentes.

6.2.1. AutoCluster e Traffic Light Pane

Na análise dos resultados, foi utilizada a ferramenta do *software Autocluster*, que aumenta a sensibilidade de detecção do sinal gerado pelas reacções de extensão dos *primers*. Numa primeira fase, o *cluster call* originou os gráficos demonstrativos da organização por *clusters*, relativamente aos genótipos para cada uma das mutações em análise. Seguidamente foi utilizada a ferramenta do *Autocluster*, de modo a aumentar a sensibilidade dos resultados.

Uma das formas de visualização dos resultados é realizada pela aplicação da ferramenta *Traffic Light Pane*, em que numa primeira análise, verifica-se o sinal de detecção

de cada uma das mutações em cada *plex*, através de um mapa de cores (verde, amarelo e vermelho) dependente do número de reacções com sucesso. A cor do poço é determinada pela comparação do rácio dos valores específicos de *thresholds*, com base no número de reacções com sucesso, como se verifica na Figura 6.1. Se o sinal de detecção for reduzido, a sensibilidade do sinal poderá ser aumentada por aplicação do *Autocluster*.

Um exemplo da aplicação do *Autocluster* é demonstrado pelas imagens do *Traffic Light Pane* da Figura 6.1. A Figura 6.1A apresenta um grande número de resultados *no call* (coloração vermelha), devido ao grande número de reacções de amplificação e de extensão realizadas com insucesso. A Figura 6.1B apresenta os resultados após a aplicação do *Autocluster*, onde ocorreu um aumento de sensibilidade dos resultados, transformando os resultados de *no call* em *call*, com atribuição de cor amarela ou verde às reacções de cada poço. No entanto, é necessário ter em atenção na utilização deste *software*, dado que aumentando a sensibilidade de leitura pode, em consequência aumentar o número de falsos positivos num ensaio.

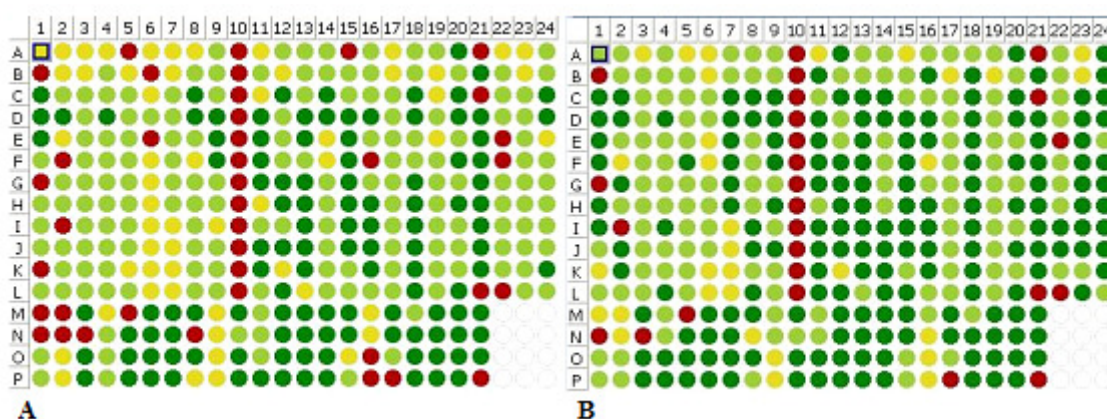


Figura 6.1. – Representação dos resultados originados pelo *software Traffic Light Pane*. A Figura 6.1A representa uma primeira análise de uma placa e a Figura 6.1B apresenta os resultados da análise da placa, após a aplicação do *Autocluster*.

6.2.2. *Call Cluster Plot e Primer Adjustment Report*

Como anteriormente referido, uma das ferramentas geradas pelo *software TYPER Analyzer 4.0* da Sequenom® é o *call cluster plot*, que auxilia a avaliação da eficiência do ensaio. Os *clusters* consistem no agrupamento dos resultados em três tipos, conforme a intensidade dos picos das duas formas alélicas: heterozigóticos, homozigóticos de massa baixa e homozigóticos de massa alta. A cada um dos alelos é atribuído um símbolo (ex: triângulos, quadradros) com uma determinada cor, estando os símbolos dispostos conforme a massa dos alelos, apresentando no eixo das abcissas (como se pode constatar no exemplo na

Figura 6.2), o alelo com a massa mais baixa e no eixo das ordenadas, o alelo com a massa mais elevada. As amostras heterozigóticas são representadas por um outro símbolo, exemplo um quadrado, enquanto as amostras homozigóticas representadas por um triângulo (Figura 6.2). Ao analisar o *call cluster plot*, é necessário ter em conta a gama de valores da extensão (representados pelo eixo das abcissas). Se estes valores estiverem entre 0 e 1, o resultado apresenta pouca fiabilidade; no entanto, para valores de extensão a partir de 4 ou 5, a extensão começa a considerar-se bastante aceitável e valores de extensão entre os 20 e os 50 representam valores de extensão óptimos, apresentando uma maior probabilidade de detecção de mutação (Sequenom[®], 2007).

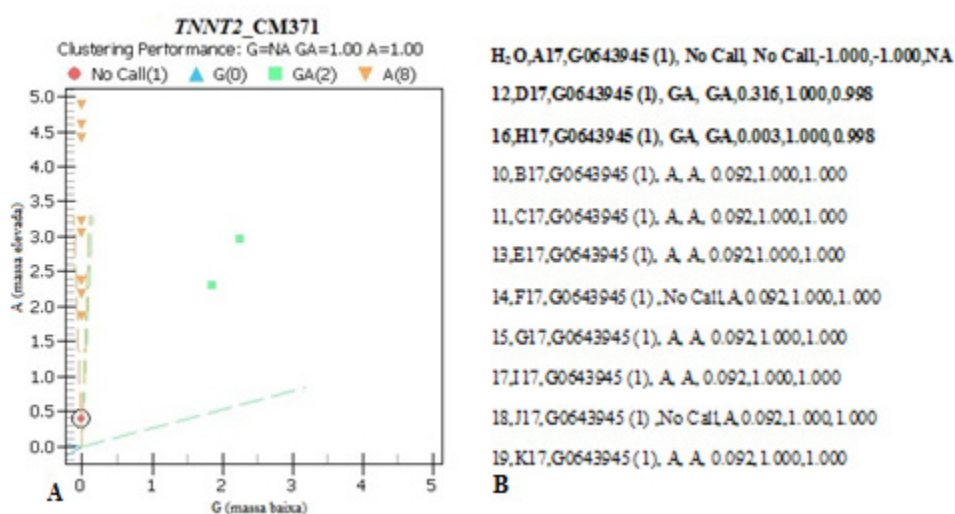


Figura 6.2 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM371 no gene *TNNT2*. A Figura 6.2A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma guanina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma adenina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos azuis: alelo G; triângulos laranjas invertidos: alelo A; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos A e G. A Figura 6.2B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 11 amostras testadas (DNAs com numeração de 10 a 19 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A17 - K17).

A Figura 6.2 apresenta um exemplo da detecção da mutação CM371 relativa ao gene *TNNT2* (*Plex17*) e ao analisar o *call cluster plot*, verifica-se que este apresenta um valor razoável de extensão e as amostras heterozigóticas (quadrados verdes; G>A) agrupam-se num grupo distinto das amostras homozigóticas normais (triângulos laranjas invertidos; AA – *wild type*). Por outro lado, o *call cluster result* apresenta o resultado de genotipagem para cada amostra testada para uma dada mutação (CM371). Neste exemplo, a identificação feita pelo *software* mostra que não ocorreu contaminação por parte da água (*no call*) e que os resultados

da genotipagem foram semelhantes antes e depois do *Autocluster*. Posteriormente, confirmou-se por SA que as amostras 12 e 16 são realmente heterozigóticas para a referida mutação.

6.2.3. Ensaio 1

Numa primeira fase, as 541 mutações foram alocadas em 21 *plexes* (Ensaio 1). A Figura 6.3 representa o desenho da placa onde os 21 *plexes* foram distribuídos por colunas, identificados pela numeração (1 a 21) (cada um com a respectiva coloração). As amostras foram distribuídas por linhas (linhas B a P), de forma a serem testadas para todos os *plexes*. Na primeira linha de cada placa (linha A) foi adicionado um controlo negativo de reacção, água bi-destilada estéril. Uma das amostras de DNA utilizada (linha B) correspondia a uma amostra utilizada como controlo negativo de mutações (amostra genotipada por sequenciação e sem mutações associadas à MH).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	1	17	
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	2	18	
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	3	19	
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	4	20	
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	5	21	
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	6		
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	7		
H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	8		
I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	9		
J	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	10		
K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	11		
L	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	29	30	31	10	19	20	21	12		
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	29	30	31	10	19	20	21	13		
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	29	30	31	10	19	20	21	14		
O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	29	30	31	10	19	20	21	15		
P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	29	30	31	10	19	20	21	16		

Figura 6.3 – Organização da placa de *iPLEX MassARRAY* com 21 *plexes* no Ensaio 1. Os *plexes* foram distribuídos por colunas, sendo identificados pela numeração (1 a 21) e pela respectiva coloração e as amostras de DNA distribuídas por linhas (linhas B a P). Na linha B encontra-se uma amostra de DNA sem mutações e na linha A encontra-se a amostra de controlo negativo (água bi-destilada estéril).

Para cada placa, o *software* gera um relatório designado *Primer Adjustment Report*, que permite fazer a análise da eficiência da mistura de *primers* necessários para estender cada mutação um dado *plex*. Este relatório tem em conta a relação inversamente proporcional entre a massa de cada analíto e o seu valor de SNR. Idealmente, os valores de SNR de todos os *primers* devem ser ajustados a valores equivalentes para garantir o sucesso na reacção de extensão da mutação. Na análise dos resultados, foi igualmente utilizado o relatório *Plate Result Report*, que fornece a descrição pormenorizada dos resultados de genotipagem, tendo em conta uma classificação baseada na significância estatística do alelo identificado

(A – conservativo; B – Moderado; C – Agressivo; D – Baixa probabilidade; E – genótipo atribuído pelo operador; N – sem alelo). Idealmente os resultados deveriam ser A ou B. Com base no *Plate Result Report* e nos resultados do *Call Cluster Plot* relativos às placas 1 e 2 do 1º ensaio, optou-se por remover 72 conjuntos de *primers* na medida em que se verificou que os parâmetros de qualidade de SNR e os verificados no *Plate Result Report* e *Call Cluster Plot* não eram adequados para uma correcta genotipagem. Assim modo a obter-se uma melhor eficiência para este conjunto de *primers* estes foram alocados noutros *plexes*.

Plex 1

O *plex 1* é composto por 37 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.4A e 6.4B), constatou-se que a grande maioria dos *primers*, apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em particular para a placa 1.

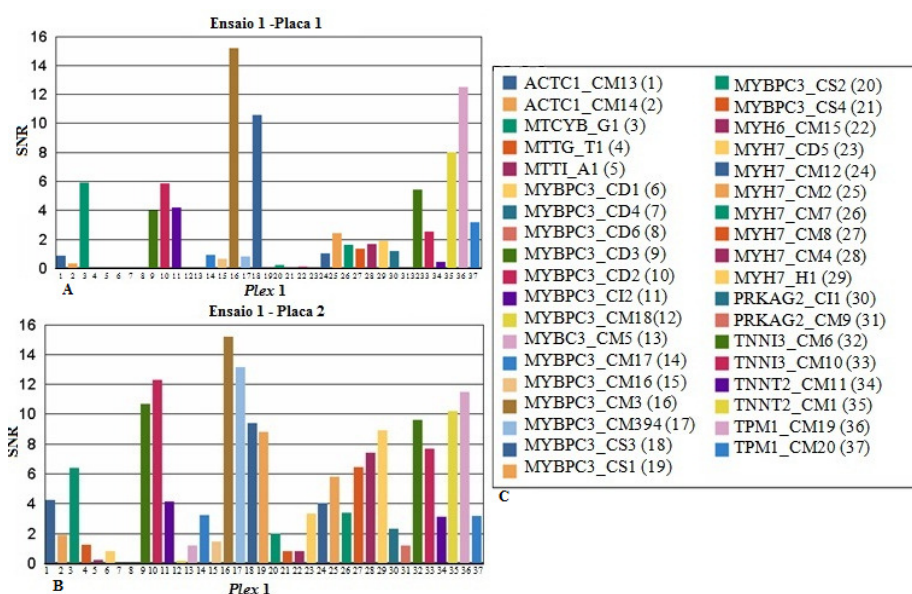


Figura 6.4 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 1 da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 37 mutações analisadas neste *plex 1*. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes/mutações correspondentes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 37 mutações neste *plex*, constatou-se que em 19 das mutações, a extensão foi insuficiente em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtivo. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas 13 conjuntos de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste

plex melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Ao analisar estas mutações, constatou-se que a mutação CM6 (posição nº 32 na Figura 6.4) no gene *TNNI3*, apresenta um valor de SNR entre 5 e 9, mas um genótipo classificado como agressivo (C) (Anexo A) e uma extensão de 0,2, daí ter sido correctamente removida deste *plex*. As mutações G1 (posição nº 3 na Figura 6.4) no gene *MTCYB* e CM18 no gene *MYBPC3* (posição nº 12, respectivamente na Figura 6.4) apresentam um genótipo de baixa probabilidade (D) e um valor de extensão de 1,0, apesar da mutação no gene *MTCYB* possui um valor de SNR de 6 e a mutação no gene *MYBPC3* um SNR de 0. Apesar de apresentarem um valor de SNR considerável, possuem um genótipo de baixa probabilidade (D) e um valor de extensão reduzida, o que justifica a remoção destas duas mutações do *plex*. No caso das mutações CM3 (posição nº 16 na Figura 6.4), CS3 (posição nº 18 na Figura 6.4) no gene *MYBPC3* e CM19 (posição nº 36 na Figura 6.4) no gene *TPM1*, CM394 (posição nº 17 na Figura 6.4) no gene *MYBPC3*; CM15 (posição nº 22 na Figura 6.4) no gene *MYH6* e CII (posição nº 30 na Figura 6.4) no gene *PRKAG2* não foi possível obter-se qualquer genótipo (N – sem alelo). Apesar de algumas destas mutações apresentarem um valor de SNR elevado (entre 10 e 17), todas apresentam valores reduzidos de extensão, entre 0,02 e 0,10, justificando a sua correcta remoção deste *plex*. Apesar dos conjuntos de *primers* referentes às mutações CD6 (posição nº 8 na Figura 6.4) no gene *MYBPC3* e CM20 (posição nº 37 na Figura 6.4) no gene *TPM1*, CS4 (posição nº 21 na Figura 6.4) no gene *MYBPC3* e CM7 (posição nº 26 na Figura 6.4) no gene *MYH7* apresentarem um genótipo moderado (B), possuem um valor de SNR relativamente baixo, entre 0 e 3 e um valor de extensão reduzido, entre 0,2 e 0,3, tendo sido correctamente retiradas do *plex*.

Como exemplo de um conjunto de *primers* correctamente retirado do *plex*, temos a mutação CM18 do gene *MYBPC3*, em que o genótipo atribuído possui baixa probabilidade e um valor de SNR de 0 e ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.5A e 6.5B) verificou-se que esta apresenta um valor de extensão reduzido, onde as amostras heterozigóticas (quadrados verdes; G>A) e as amostras homozigóticas (triângulos laranjas invertidos; AA), encontram-se agrupadas ao longo do gráfico. Acresce ainda que para a maioria das amostras não se detectou qualquer genótipo antes do *Cluster Call* (Figura 6.5B). Estes factores justificam a remoção correcta desta mutação do *plex*, para futura optimização.

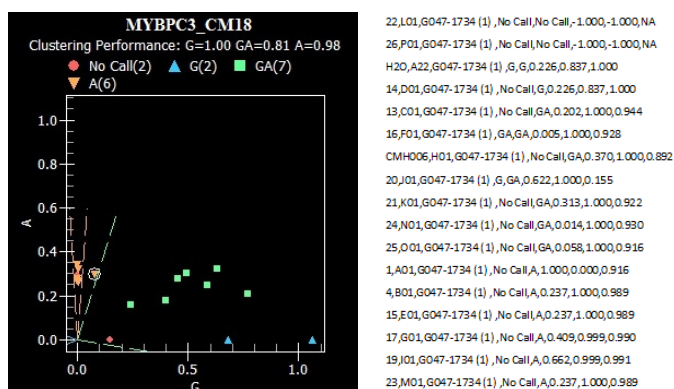


Figura 6.5 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM18 no gene *MYBPC3*. A Figura 6.5A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma guanina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma adenina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos azuis: alelo G; triângulos laranjas invertidos: alelo A; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos G e A. A Figura 6.5B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A01 – P01).

Plex 2

O *plex 2* é composto por 37 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.6A e 6.6B), constatou-se que a grande maioria dos *primers* apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em particular para a placa 1.

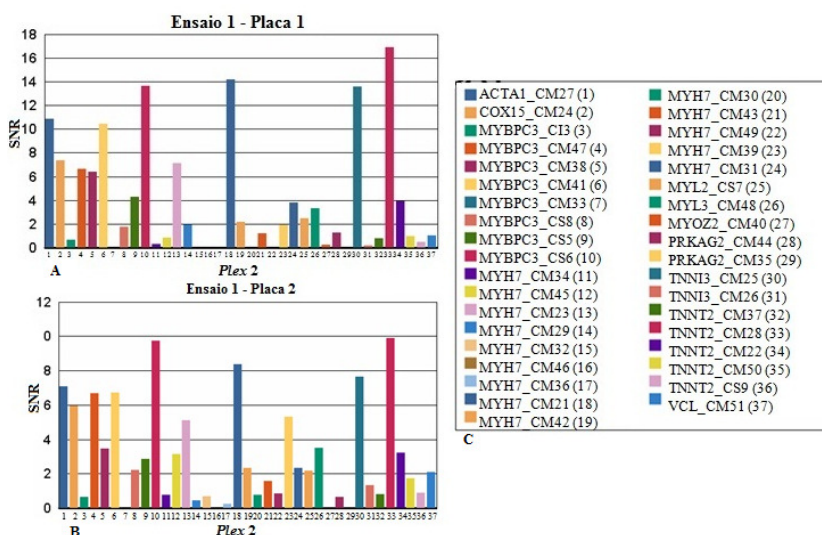


Figura 6.6 – Figura A e B - *Primer Adjustment Report* para o *plex 2* da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 37 mutações analisadas neste *plex 2*. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 37 mutações neste *plex*, constatou-se que em 23 mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas 8 conjuntos de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Por exemplo, apesar das mutações CM41 (posição nº 6 na Figura 6.6) no gene *MYBPC3*, CM25 (posição nº 30 na Figura 6.6) no gene *TNNI3* e CM42 (posição nº 19 na Figura 6.6) no gene *MYH7* apresentarem um valor de SNR elevado, entre 7 a 19, possuem um genótipo de baixa probabilidade (D) e uma extensão de 0,2. As mutações CI3, CM47 e CS6 (posição nº 3, nº 4 e nº 10, respectivamente na Figura 6.6) no gene *MYBPC3*; CM28 (posição nº 33 na Figura 6.6) no gene *TNNT2*; CM21 (posição nº 18 na Figura 6.6) no gene *MYH7* não apresentam qualquer alelo (N – sem alelo), os valores de SNR são aceitáveis, entre 6 e 14, mas os valores de extensão são reduzidos, entre 0,04 e 0,3, sendo necessário portanto repetir a genotipagem para estas mutações. Apesar destas mutações apresentarem um valor de SNR aceitável, possuem um valor de extensão reduzido e uma categoria do genótipo atribuído inesperada e com base nestes últimos dois parâmetros, foram correctamente retiradas deste *plex*.

Como exemplo de um conjunto de *primers* correctamente retirado do *plex*, temos a mutação CI3 no gene *MYBPC3*, com um valor de SNR de 1 e sem genótipo identificado e ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.7A e 6.7B), verificou-se que esta mutação apresenta um valor de extensão reduzido, em que a amostra heterozigótica (quadrados verdes; deleção G) e as amostras homozigóticas (triângulos azuis; GG) encontram-se agrupadas, conseguindo-se uma clara separação das amostras homozigóticas para o alelo de menor massa. Estes factores (extensão e o valor de SNR reduzidos) justificam a remoção correctamente deste conjunto de *primers* do *plex*, para futura optimização.

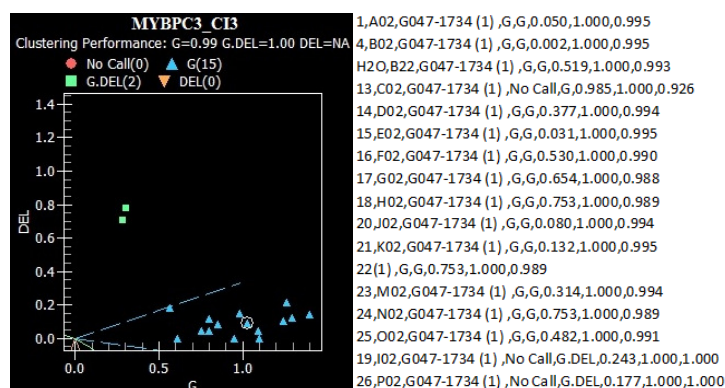


Figura 6.7 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CI3 no gene *MYBPC3*. A Figura 6.7A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma guanina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (uma deleção). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos azuis: alelo G; quadrados verdes: amostras com a deleção do G. A Figura 6.7B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A02 – P02).

Plex 3

O *plex 3* é igualmente composto por 37 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.8A e 6.8B), constatou-se que muitos dos conjuntos de *primers* apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em particular para a placa 2.

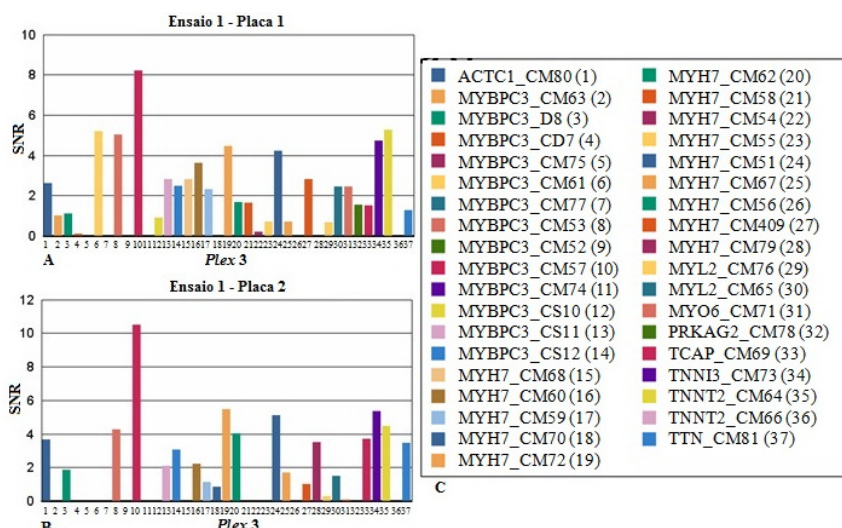


Figura 6.8 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 3 da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 37 mutações analisadas neste *plex 3*. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 37 mutações nestes *plex*, constatou-se que em 29 mutações, a extensão foi insuficiente em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas 7 conjuntos de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Por exemplo, a mutação CM65 (posição nº 30 na Figura 6.8) no gene *MYL2* possui um

genótipo de baixa probabilidade (D), um valor de SNR de 2 e um valor de extensão reduzido, entre de 0,4, tendo sido correctamente retirado do *plex*. No caso das mutações CM61 (posição nº 6 na Figura 6.8) no gene *MYBPC3*; CM68 (posição nº 15 na Figura 6.8) no gene *MYH7*; CM71 (posição nº 31 na Figura 6.8) no gene *MYO6*; CM72 (posição nº 19 na Figura 6.8) no gene *MYH7* e CM73 (posição nº 34 na Figura 6.8) no gene *TNNI3* não se conseguiu identificar os alelos (N – sem alelos) e apesar de apresentarem um valor de SNR de 0 a 5, a extensão em qualquer mutação é reduzida, entre 0,2 e 1,6, sendo necessário repetir a genotipagem para estas mutações e comprovando que estas mutações foram correctamente retiradas do *plex*. Além desta mutação CS10 (posição nº 12 na Figura 6.8) no gene *MYBPC3* apresentar um valor de SNR baixo, de 1, possui um genótipo conservativo (A) e ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.9A e 6.9B) constatou-se que esta possui valor da extensão é aceitável, de 4, logo concluiu-se que esta mutação provavelmente deveria ter permanecido no *plex*, tendo sido a análise, realizada de um forma incorrecta pelo operador na altura do ensaio, dado que neste caso, só teve por base o valor de extensão (que neste caso é aceitável), devendo ter tido também em consideração os outros dois parâmetros, o valor do SNR e o genótipo atribuído. Todas as amostras homozigóticas (triângulos laranjas invertidos; alelo GG) encontram-se agrupadas no eixo dos alelos de massa mais elevada.

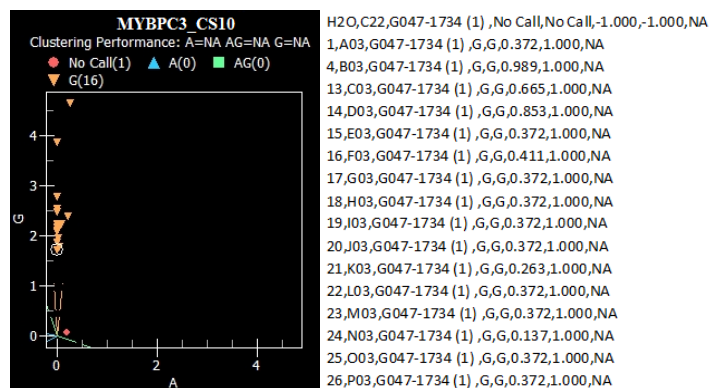


Figura 6.9 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de primers para a detecção da mutação CS10 no gene *MYBPC3*. A Figura 6.9A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma adenina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma guanina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos azuis: alelo A; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos A e G. A Figura 6.9B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 17 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A03 – P03).

Plex 4

O *plex 4* é igualmente composto por 37 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.10A e 6.10B), constatou-se que muitos dos conjuntos de *primers* apresentavam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em ambas as placas 1 e 2.

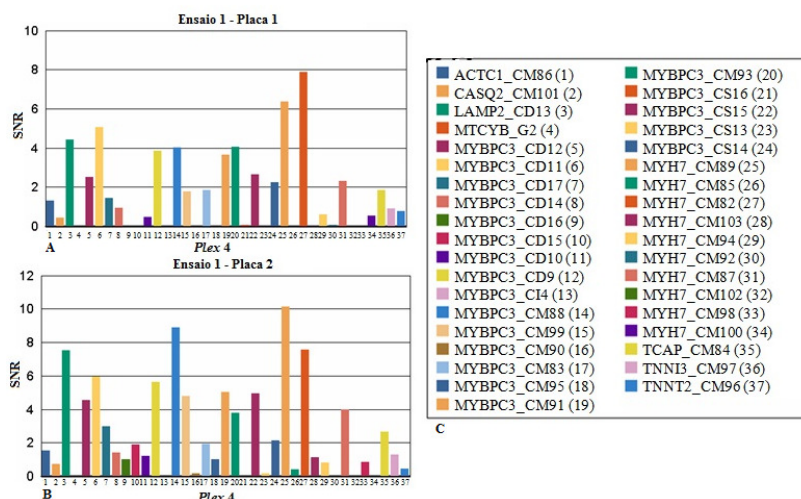


Figura 6.10 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex 4* da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 37 mutações analisadas neste *plex 4*. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 37 mutações neste *plex*, constatou-se que em 25 das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas 6 conjuntos de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Apesar das mutações CM91 (posição nº 19 na Figura 6.10) no gene *MYBPC3* e CM89 (posição nº 25 na Figura 6.10) no gene *MYH7* apresentarem um valor de SNR aceitável, entre 5 e 10, possuem um genótipo de baixa probabilidade (D) e um valor de extensão reduzido, entre 0,03 e 1,5. No gene *MYBPC3*, as mutações CD11 (posição nº 6 na Figura 6.10) e CD10 (posição nº 11 na Figura 6.10), mesmo com um valor de SNR aceitável, de 5, estas duas mutações não apresentam qualquer genótipo identificado (sem alelos – N) e possuem um valor de extensão reduzido, entre 0,0 e 1,0, sendo necessário repetir a genotipagem para estas mutações. Por estas razões estas duas mutações foram correctamente retiradas deste *plex*. Apesar das mutações CM90 (posição nº 16 na Figura 6.10) no gene *MYBPC3* e CM98

(posição nº 33 na Figura 6.10) no gene *MYH7*, apresentarem um genótipo conservativo (A), possuem valores de extensão reduzidos, entre 1,0 e 1,8 e valores de SNR, entre 0 e 2. Isto justifica a correcta remoção destas mutações deste *plex*.

Como exemplo de um conjunto de *primers* correctamente removido deste *plex*, temos a mutação CD11 do gene *MYBPC3*, que apesar de apresentar um SNR aceitável, não foi identificado qualquer genótipo e ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.11A e 6.11B), constatou-se que um elevado número de amostras sem genótipo e um valor de extensão bastante reduzido, apesar do valor de SNR ser aceitável. Todos estes factores justificam a remoção deste conjunto de *primers* do *plex* para uma futura optimização. As amostras heterozigóticas (quadrados verdes; deleção CG) e homozigóticas (triângulos azuis; deleção) encontram-se agrupadas no eixo dos alelos com massa elevada.

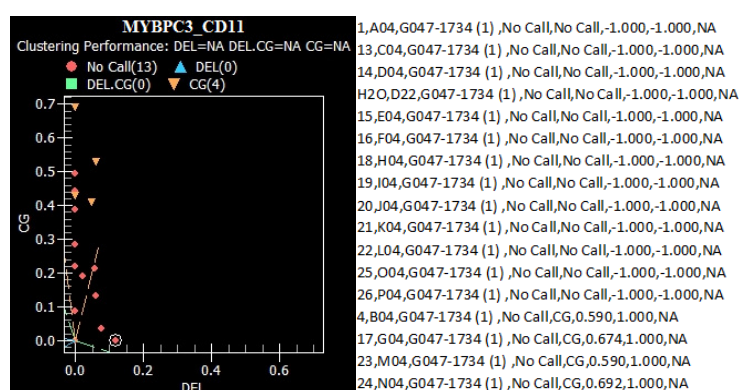


Figura 6.11 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CD11 no gene *MYBPC3*. A Figura 6.11A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma deleção CG) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma deleção CG). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos azuis: deleção; quadrados verdes: deleção CG. A Figura 6.11B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 14 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A04 – P04).

Plex 5

O *plex 5* é igualmente composto por 37 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.12A e 6.12B), constatou-se que a maioria dos conjuntos de *primers* apresentavam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em ambas as placas 1 e 2.

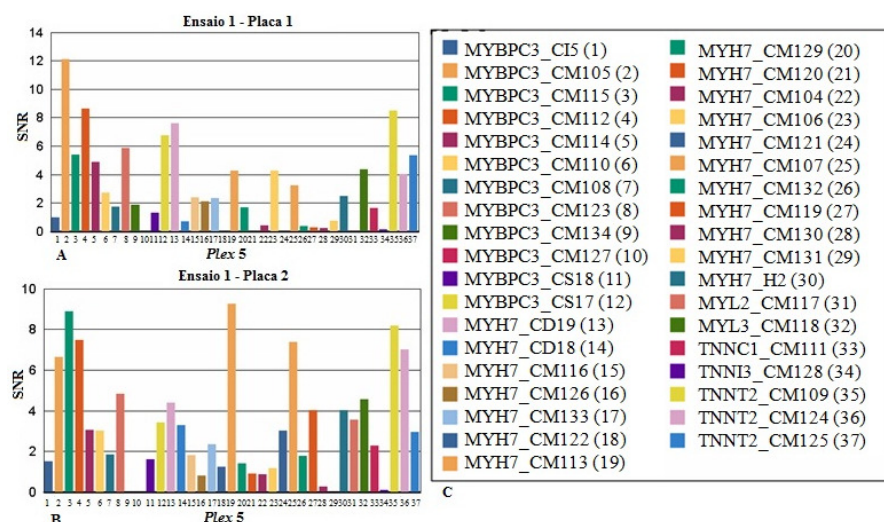


Figura 6.12 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 5 da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 37 mutações analisadas neste *plex* 5. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 37 mutações neste *plex*, constatou-se que em 23 das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas 4 conjuntos de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Por exemplo, para os três conjuntos de *primers* referentes às mutações CS18 (posição nº 11 na Figura 6.12), CM108 (posição nº 7 na Figura 6.12) e CM123 (posição nº 8 na Figura 6.12) no gene *MYBPC3*, não existe nenhum genótipo identificado (sem alelos – N), sendo necessário repetir a genotipagem para estas mutações. Por outro lado, todas as 3 mutações apresentam um valor de extensão reduzido, entre 0,2 e 0,8 e em relação ao valor de SNR, as duas primeiras mutações possuem um valor de SNR entre 1 e 2 e a última mutação um SNR entre 4 e 6, respectivamente. Por estas razões, considera-se que estas 3 mutações foram correctamente removidas de *plex*. Apesar da mutação CM124 (posição nº 36 na Figura 6.12) no gene *TNNT2* possuir um genótipo moderado (B) e um valor de SNR entre 4 e 7, apresenta um valor de extensão reduzido, entre 0,6 e 2, daí ter sido removido deste *plex*.

Como exemplo de um conjunto de *primers* correctamente removido do *plex*, temos a mutação CM108 no gene *MYBPC3*, que além de apresentar um valor de SNR reduzido, não foi identificado qualquer genótipo e ao analisar o *Call Cluster* (Figura 6.13A e 6.13B),

observou-se um valor de extensão reduzido, observando-se igualmente um grande número de amostras homozigóticas (triângulo azul; alelo CC), localizadas no eixo dos alelos de massa baixa. Todos estes factores justificam a remoção deste conjunto de *primers* do *plex*, para futura optimização. Não existe nenhum genótipo heterozigótico.

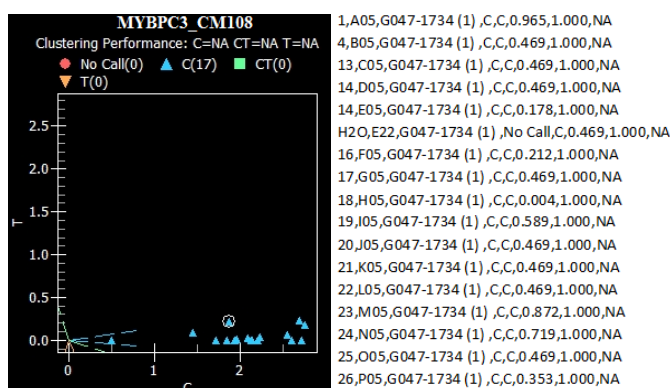


Figura 6.13 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM108 no gene *MYBPC3*. A Figura 6.13A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma citosina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma timina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: alelo T; triângulos azuis: alelo C; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos C e T. A Figura 6.13B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A05 – P05).

Plex 6

O *plex* 6 é composto por 35 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.14A e 6.14B), constatou-se que a maioria dos conjuntos de *primers* apresenta valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, maioritariamente na placa 2.

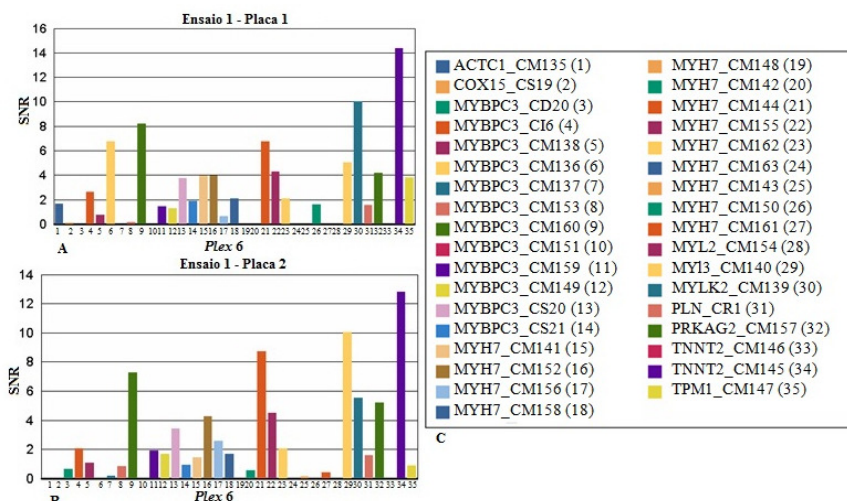


Figura 6.14 – Figura A e B - *Primer Adjustment Report* para o *plex* 6 da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 35 mutações analisadas neste *plex* 6. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 35 mutações, constatou-se que em 25 das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas 7 conjuntos de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Por exemplo, apesar do valor de SNR ser aceitável, entre 4 e 14 para estas mutações CM141 (posição nº 15 na Figura 6.14) no gene *MYH7*; CM139 (posição nº 30 na Figura 6.14) no gene *MYLK2* e CM145 (posição nº 34 na Figura 6.14) no gene *TNNT2*, todas apresentam um genótipo com baixa probabilidade (D) e um valor de extensão reduzido, entre 0,4 e 2,5. Também para as mutações CM140 (posição nº 29 na Figura 6.14) no gene *MYL3* e CM157 (posição nº 32 na Figura 6.14) no gene *PRKAG2*, o valor de SNR é aceitável, entre 5 e 10, mas não apresentam nenhum genótipo identificado (sem alelos – N) e o valor de extensão é reduzido, entre 0,3 e 0,8, sendo necessário portanto repetir a genotipagem para estas mutações. Apesar das mutações CM163 (posição nº 24 na Figura 6.14) e CM161 (posição nº 27 na Figura 6.14) no gene *MYH7*, apresentarem uma significância estatística conservativa (A), apresentam um valor de SNR nulo e um valor de extensão reduzido, entre 0,0 a 0,4. Estas razões comprovam a correcta remoção destas mutações do *plex*.

Como exemplo de um conjunto de *primers* correctamente removido do *plex*, temos a mutação CM157 do gene *PRKAG2*, que além de apresentar um valor de SNR de 4, não foi identificado qualquer genótipo e ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.15A e 6.15B) verificou-se que o valor de extensão é reduzido e eu não houve identificação de nenhuma amostra. Estes factores justificam a correcta remoção deste conjunto de *primers* do *plex*, para futura optimização.

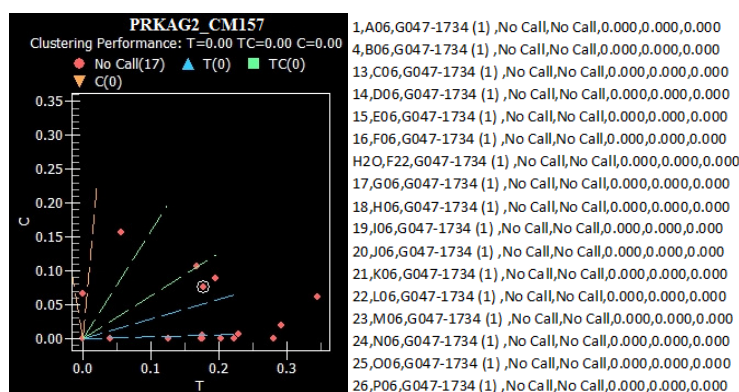


Figura 6.15 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM157 no gene *PRKAG2*. A Figura 6.15A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma timina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma citosina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: alelo C; triângulos azuis: alelo T; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos T e C. A Figura 6.15B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A06 – P06).

Plex 7

O *plex 7* é constituído por 33 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.16A e 6.16B), constatou-se que a maioria dos *primers* apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em ambas as placas 1 e 2.

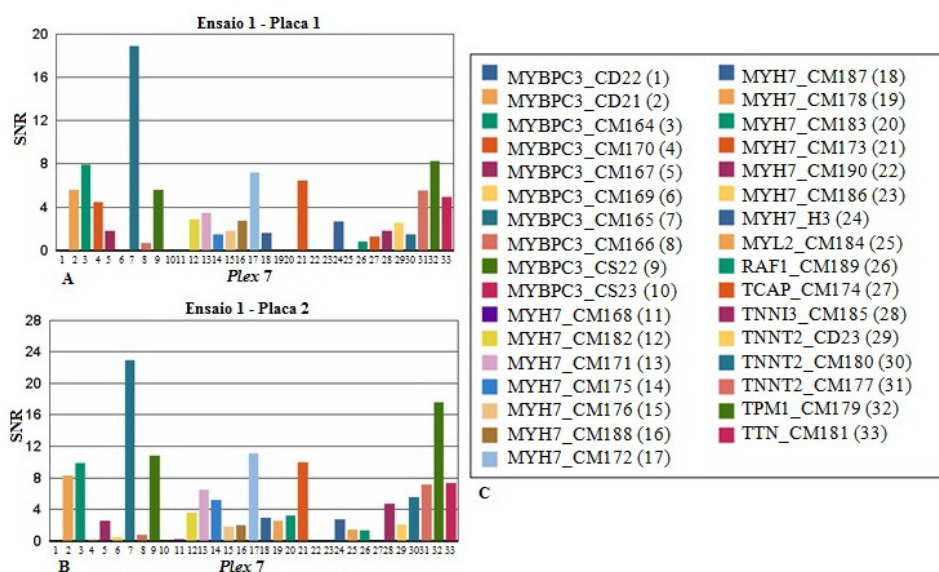


Figura 6.16 – Figura A e B - *Primer Adjustment Report* para o *Plex 7* da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 33 mutações analisadas neste *Plex 7*.

Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 33 mutações neste *plex*, constatou-se que em 21 das mutações, a extensão foi insuficiente em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas 3 conjuntos de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Apesar das mutações CM170 (posição nº 4 na Figura 6.16) no gene *MYBPC3* e CM175 (posição nº 14 na figura 6.16) no gene *MYH7* apresentarem um genótipo de baixa probabilidade (D) e um valor de extensão reduzido, entre 0,7 e 1,0, possuem um valor de SNR de 1 e 5, respectivamente. Por outro lado, a mutação CS22 (posição nº 9 na Figura 6.16) no gene *MYBPC3*, possui um genótipo agressivo (C) e um valor de extensão reduzido, de 2,0, apesar do valor de SNR ser elevado, de 10. Apesar destas mutações apresentarem um valor de SNR aceitável, foram removidas deste *plex* correctamente, tendo em conta os valores de extensão e o genótipo atribuído a cada uma delas.

Como exemplo de um conjunto de *primers* correctamente removido do *plex*, temos a mutação CM175 do gene *MYBPC3*, que apesar de ter um valor de SNR aceitável, possui um genótipo de baixa probabilidade e ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.17A e 6.17B), comprovou-se que o valor de extensão também é reduzido. As duas amostras heterozigóticas (quadrados verdes; C>T) encontram-se agrupadas perto das amostras homozigóticas (triângulos azuis; CC), que estão agrupadas no eixo dos alelos de massa elevada. Todos estes factores justificam a remoção deste conjunto de *primers* do *plex*, para futura optimização.

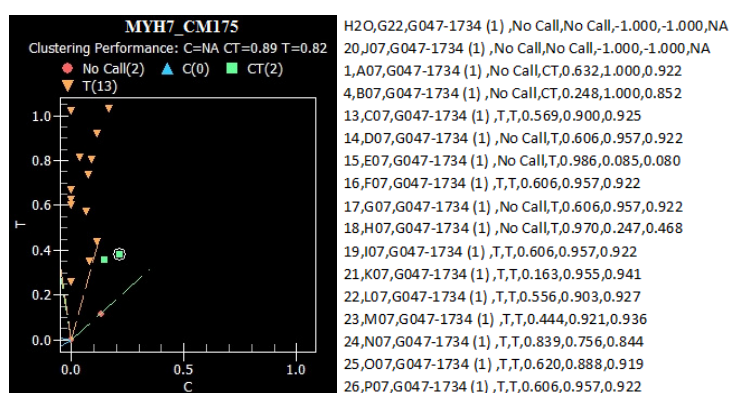


Figura 6.17 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM175 no gene *MYH7*. A Figura 6.17A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma citosina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com

a massa mais elevada (neste caso uma timina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: alelo T; triângulos azuis: alelo C; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos C e T. A Figura 6.17B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A07 – P07).

Plex 8

O *plex 8* é constituído por 31 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.18A e 6.18B), constatou-se que muitos dos *primers* apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, maioritariamente na placa 2.

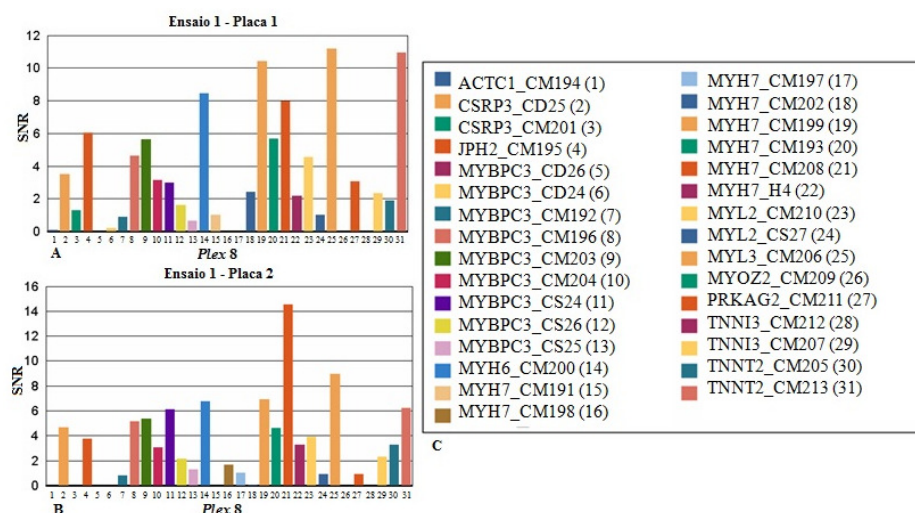


Figura 6.18 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 8 da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 31 mutações analisadas neste *plex 8*. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 31 mutações neste *plex*, constatou-se que em 19 das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido, daí se justificarem a sua remoção do *plex*. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas 5 conjuntos de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Apesar das mutações CM204 (posição nº 10 na Figura 6.18) no gene *MYBPC3*; H4 (posição nº 22 na Figura 6.18) no gene *MYH7* e CM196 (posição nº 8 na Figura 6.18) no gene *MYBPC3* apresentam um valor de SNR

aceitável, entre 3 e 5, possuem um genótipo atribuído de agressivo (C), baixa probabilidade (D) e sem identificação de genótipo (sem alelos – N), respectivamente, com um valor de extensão igualmente reduzido, entre 0,3 e 1,5, sendo necessário repetir a genotipagem para estas mutações. Por estas razões, estas 3 mutações foram correctamente removidas do *plex*. As mutações CM195 (posição nº 4 na Figura 6.18) no gene *JPH2* possui um genótipo conservativo (A), um valor de SNR aceitável de 6 e um valor de extensão de 1,5 e CM205 (posição nº 30 na Figura 6.18) no gene *TNNT2* com um genótipo também conservativo (A), com um valor de extensão aceitável, de 5, mas com um valor de SNR reduzido, de 3, possivelmente não deveriam ter sido removidas do *plex*, tendo sido a análise destas duas mutações, realizada de um forma incorrecta pelo operador na altura do ensaio, dado que só teve por base o valor de extensão (que neste caso é aceitável) de cada uma delas e deveria ter tido em consideração o genótipo atribuído e o valor do SNR.

Como exemplo de um conjunto de *primers* correctamente removido do *plex*, temos a mutação CM204 do gene *MYBPC3*, com um genótipo agressivo, um valor de SNR baixo e ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.19A e 6.19B) verificou-se que existem 4 amostras sem genótipo identificado, apresentando um valor de extensão reduzido. Todos estes factores justificam a remoção correcta deste conjunto de *primers* do *plex*, para futura optimização. A maioria das amostras são homozigóticas (triângulo azul; alelo G), havendo 2 amostras heterozigóticas (quadrados verdes; G>A), encontrando-se dispersas pelo gráfico.

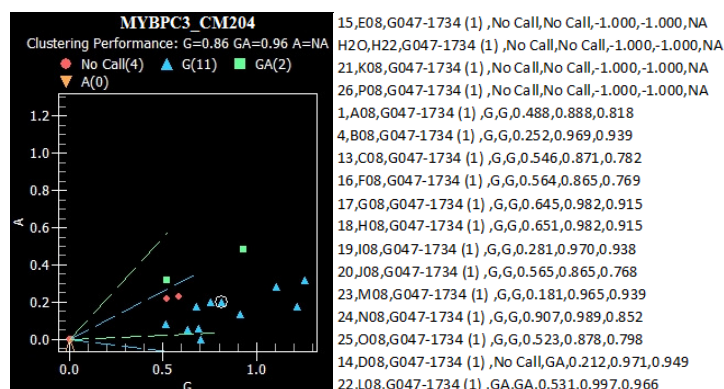


Figura 6.19 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM204 no gene *MYBPC3*. A Figura 6.19A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma guanina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma adenina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: alelo A; triângulos azuis: alelo G; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos G e A. A Figura 6.19B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A08 – P08).

Plex 9

O *plex 9* é constituído por 32 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.20A e 6.20B), constatou-se que constatou-se que alguns dos *primers* apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em ambas as placas 1 e 2.

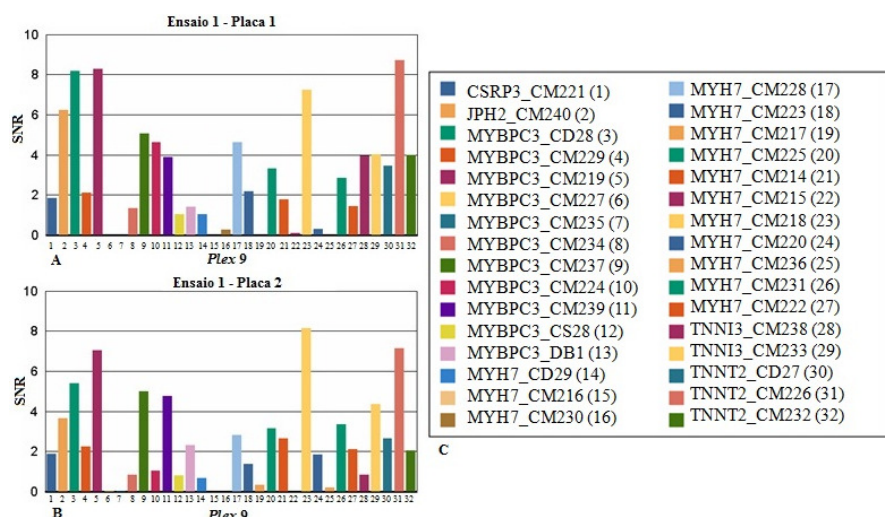


Figura 6.20 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 9 da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 32 mutações analisadas neste *plex 9*. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 31 mutações neste *plex*, constatou-se que em 20 das mutações, a extensão foi insuficiente em sintonia com baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas 2 conjuntos de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Por exemplo, a mutação CM240 (posição nº 2 na Figura 6.20) no gene *JPH2* possui um genótipo de baixa probabilidade (D), um valor de SNR aceitável de 6, mas um valor de extensão reduzido, de 0,75, enquanto a mutação CD28 (posição nº 3 na Figura 6.20) no gene *MYBPC3* possui um genótipo conservativo (A), um valor de SNR reduzido, de 2 e um valor de extensão de 1. Com base nestas razões, estas duas mutações foram correctamente removidas do *plex*.

Como exemplo de um conjunto de *primers* bem removido do *plex*, temos a mutação CM240 do gene *JPH2*, apesar do valor de SNR elevado, possui um genótipo de baixa probabilidade e ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.21A e 6.21B) verificou-se que existe

um número elevado de amostras sem genótipo, agrupadas pelo eixo dos alelos com massa elevada, em que a extensão é bastante reduzida. Todos estes factores justificam a remoção deste conjunto de *primers* do *plex*, para futura optimização. As restantes amostras são maioritariamente homozigóticas (triângulos azuis; alelo TT) e uma amostra heterozigótica (quadrados verdes; T > C), dispersas pelo gráfico.

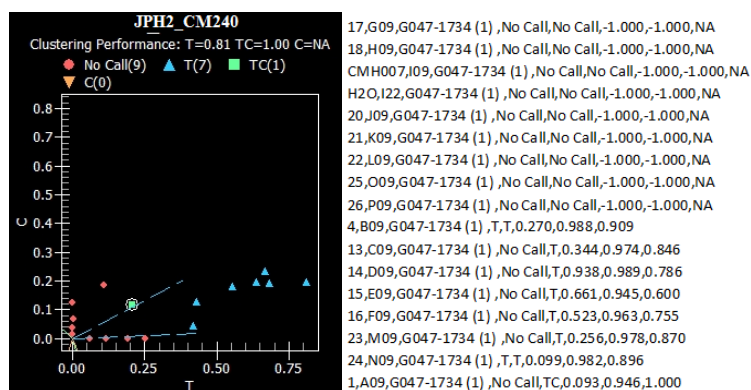


Figura 6.21 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM240 no gene *JPH2*. A Figura 6.21A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma timina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma citosina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: alelo C; triângulos azuis: alelo T; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos T e C. A Figura 6.21B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A09 – P09).

Plex 10

O *plex 10* é constituído por 29 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.22A e 6.22B), constatou-se que muitos dos conjuntos de *primers* apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em ambas as placas 1 e 2.

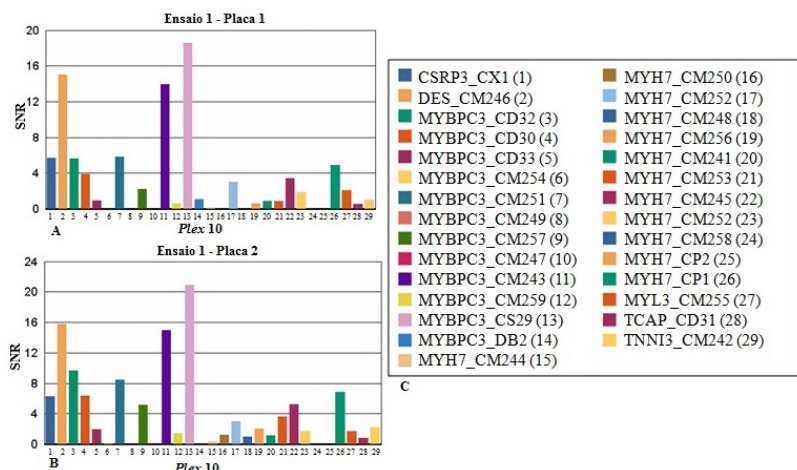


Figura 6.22 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 10 da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 29 mutações analisadas neste *plex* 10. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 29 mutações neste *plex*, constatou-se que em 20 das mutações, a extensão foi insuficiente em sintonia com baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas 2 conjuntos de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Por exemplo, a mutação CM246 (posição nº 2 na Figura 6.22) no gene *DES* possui um genótipo de baixa probabilidade (D), um valor de SNR elevado, entre 14 e 16, mas um valor de extensão reduzido, de 1,4, enquanto ao analisar *Call Cluster Plot* (Figura 6.23A e 6.23B) da mutação CS29 (posição nº 13 na Figura 6.22) no gene *MYBPC3* verifica-se que esta possui uma extensão aceitável, de 3, mas não o genótipo não foi identificado (sem alelos – N), possuindo também um valor de SNR reduzido, de 3. Com base nestas razões, estas duas mutações foram correctamente removidas do *plex*. Todas as amostras são homozigóticas (triângulos azuis; alelo CC), encontrando agrupadas no eixo dos alelos de massa baixa.

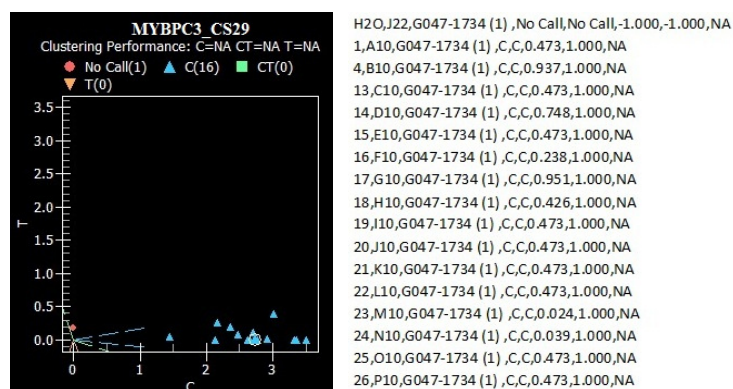


Figura 6.23 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CS29 no gene *MYBPC3*. A Figura 6.23A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma citosina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma timina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: alelo T; triângulos azuis: alelo C; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos C e T. A Figura 6.23B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A10 – P10).

Plex 11

O *plex* 11 é constituído por 28 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores do SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 no Ensaio 1 (Figura 6.24A e 6.24B), constatou-se que a maioria dos conjuntos de *primers* apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em ambas as placas 1 e 2.

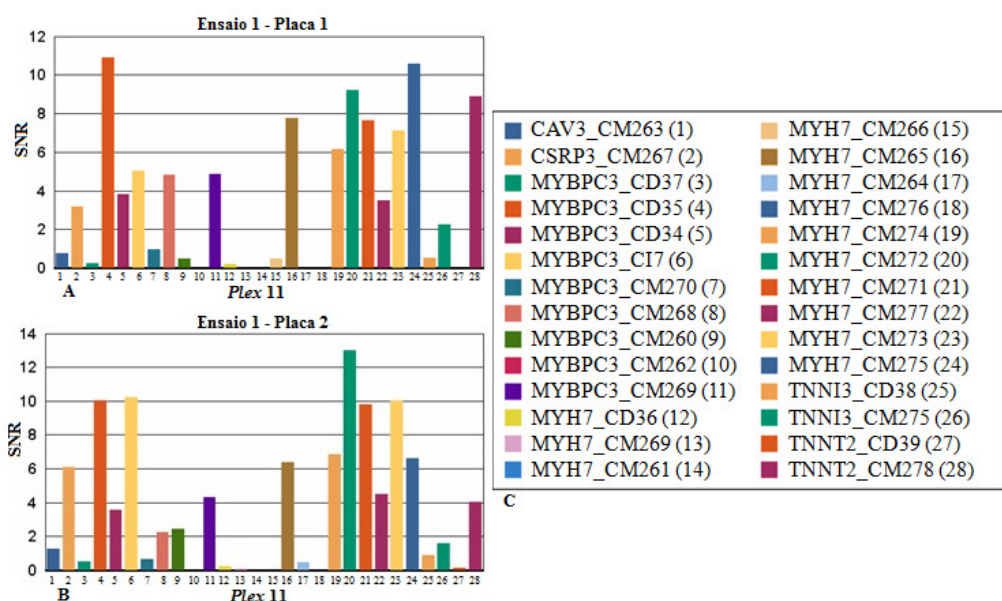


Figura 6.24 – Figura A e B - *Primer Adjustment Report* para o *plex* 11 da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 28 mutações analisadas neste *plex* 11.

Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 28 mutações neste *plex*, constatou-se que em 16 das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas um conjunto de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Esta mutação CI7 (posição nº 6 na Figura 6.25) no gene *MYBPC3*, possui um genótipo conservativo (A), um valor de SNR aceitável, entre 5 e 10 e ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 25A e 25B), constatou-se que o valor de extensão não é baixo, de 3. Tendo em conta estes dados, provavelmente este conjunto de *primers* deveria ter permanecido no *plex*, tendo sido a análise desta mutação, realizada de um forma incorrecta pelo operador na altura do ensaio, dado que só teve por base o valor de extensão (neste caso é aceitável) e deveria ter tido em consideração o genótipo atribuído e o valor do SNR. Todas as amostras são homozigóticas (triângulos azuis; alelo CC), agrupadas no eixo dos alelos de massa baixa.

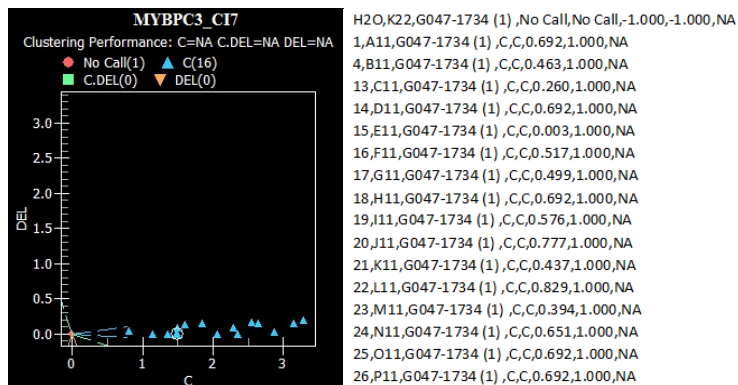


Figura 6.25 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM242 no gene *TNNI3*. A Figura 6.25A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma citosina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma deleção C). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: deleção; triângulos azuis: alelo C; quadrados verdes: deleção C. A Figura 6.25B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A11 – P11).

Plex 12

O *plex* 12 é constituído por 25 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.26A e 6.26B), constatou-se que muitos dos *primers* apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em ambas as placas 1 e 2.

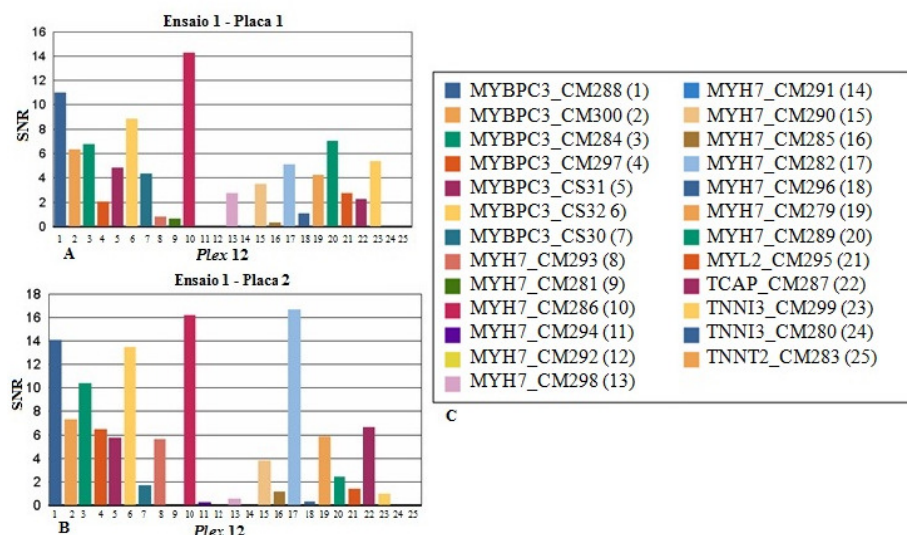


Figura 6.26 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex* 12 da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 25 mutações analisadas neste *plex* 12. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 25 mutações neste *plex*, constatou-se que em 13 mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas 3 conjuntos de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. A mutação CM290 (posição nº 15 na Figura 6.26) no gene *MYH7* apresenta um valor de SNR aceitável, de 4, mas sem um genótipo atribuído (N – sem alelos), mas com um valor de extensão de 2,0, sendo necessário portanto repetir a genotipagem para estas mutações. Apesar das mutações CM295 (posição nº 21 na Figura 6.26) no gene *MYL2* e CM281 (posição nº 9 na Figura 6.26) no gene *MYH7* apresentarem um genótipo conservativo (A) e moderado (B) respectivamente, possuem um valor de SNR reduzido, entre 0 e 2 e um valor de extensão de 1,0. Estes factores justificam a correcta remoção desta mutação do *plex*.

Como exemplo de um conjunto de *primers* que deveria ter permanecido no *plex*, temos a mutação CM295 do gene *MYL2*, apesar do valor de SNR baixo, de 2, possui um genótipo conservativo e ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.27A e 6.27B), constatou-se que o valor de extensão é aceitável, de 3. As amostras homozigóticas (triângulos azuis; alelo GG) encontram-se agrupadas no eixo dos alelos de massa baixa, enquanto as amostras heterozigóticas (quadrados verdes; G>A), estão agrupadas perto. Tendo em conta que apenas o valor do SNR é reduzido e apresenta um valor de extensão aceitável e um genótipo conservativo, esta mutação deveria ter permanecido no *plex*, tendo sido a análise, realizada de um forma incorrecta pelo operador na altura do ensaio, dado que neste caso, só teve por base o valor de extensão (neste caso é aceitável), devendo também ter tido em consideração os outros dois parâmetros, o valor do SNR e o genótipo atribuído.

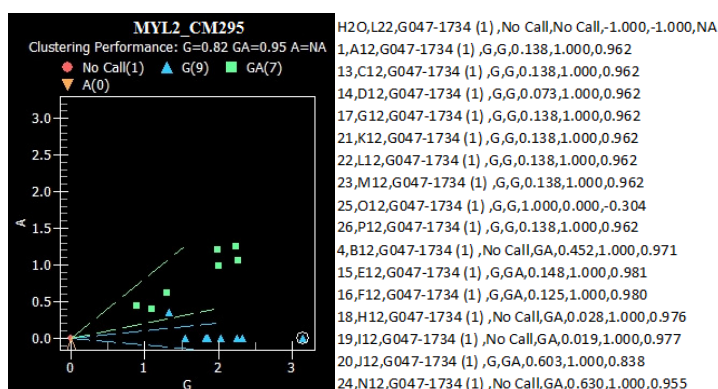


Figura 6.27 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM242 no gene *TNNI3*. A Figura 6.27A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma guanina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma adenina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: alelo A; triângulos azuis: alelo G; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos G e A. A Figura 6.27B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A12 – P12).

Plex 13

O *plex* 13 é constituído por 25 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.28A e 6.28B), constatou-se que muitos dos *primers* apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em ambas as placas 1 e 2.

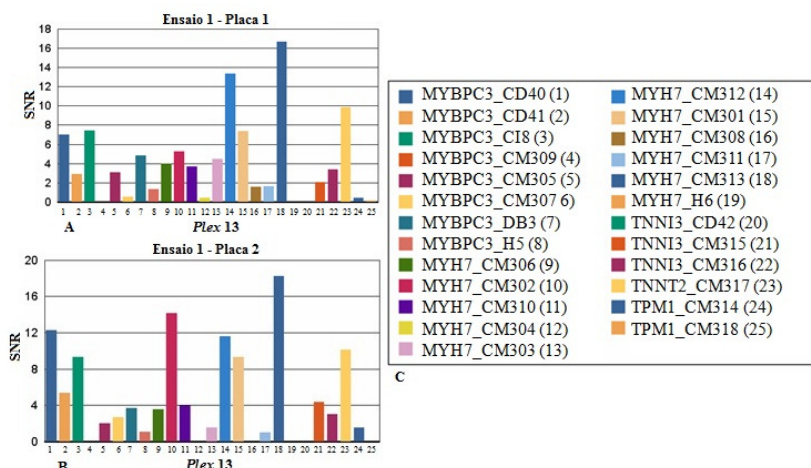


Figura 6.28 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 13 da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 25 mutações analisadas neste *plex* 13. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 25 mutações neste *plex*, constatou-se que em 14 mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas um conjunto de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. A mutação CM302 (posição nº 10 na Figura 6.28) no gene *MYH7*, apesar de possuir um genótipo de baixa probabilidade (D), apresenta um valor de SNR elevado, entre 4 e 14 e ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.29A e 6.29B), constatou-se que valores de extensão começam a ser aceitáveis, de 2. Excepto uma amostra homozigótica (triângulo laranja invertido; alelo G), as restantes amostras são heterozigóticas (quadrados verdes; C>G), encontrando-se agrupadas pelo gráfico. Apesar do valor de SNR ser elevado e do valor da extensão começar a ser aceitável para o ensaio, o genótipo atribuído é de baixa probabilidade, em que provavelmente esta mutação deveria ter permanecido no *plex*, tendo sido a análise, realizada de um forma incorrecta pelo operador na altura do ensaio, dado que neste caso, só teve por base o valor de extensão (que neste caso é aceitável este é elevado), devendo também ter tido em consideração os outros dois parâmetros, o valor do SNR e o genótipo atribuído.

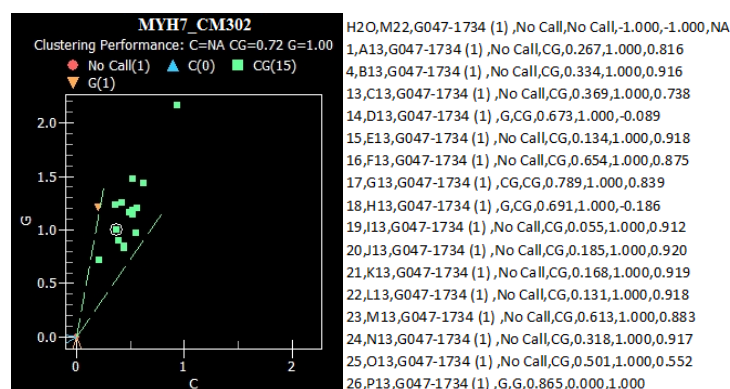


Figura 6.29 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM302 no gene *MYH7*. A Figura 6.29A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma citosina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma guanina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: alelo G; triângulos azuis: alelo C; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos C e G. A Figura 6.29B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A13 – P13).

Plex 14

O *plex* 14 é constituído por 22 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.30A e 6.30B), constatou-se que que muitos dos *primers* apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em ambas as placas 1 e 2.

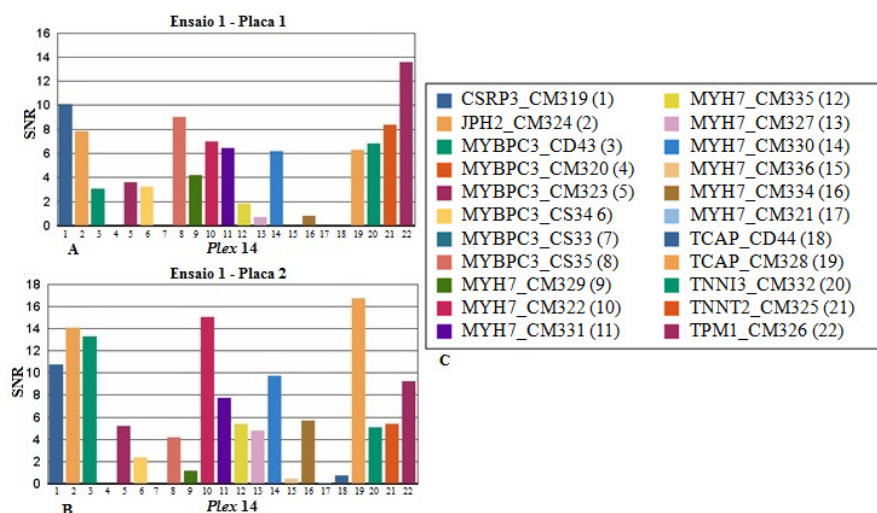


Figura 6.30 – Figura A e B - *Primer Adjustment Report* para o *plex* 14 da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 22 mutações analisadas neste *plex* 14. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 22 mutações neste *plex*, constatou-se que em 7 mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas um conjunto de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. A mutação CM324 (posição nº 2 na Figura 6.30) no gene *JPH2*, apesar de ter um valor de extensão de SNR elevado, entre 8 e 14, apresenta um genótipo de baixa probabilidade (D) e ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.31A e 6.31B), constatou-se que o valor de extensão é baixo, de 1,5. Estes factores justificam a correcta remoção desta mutação do *plex*. Maioritariamente as amostras são heterozigóticas (quadrados verdes; G>A) encontrando-se agrupadas no gráfico, existindo 4 amostras sem genótipo identificado e apenas uma amostra homozigótica (triângulo laranja invertido; alelo A).

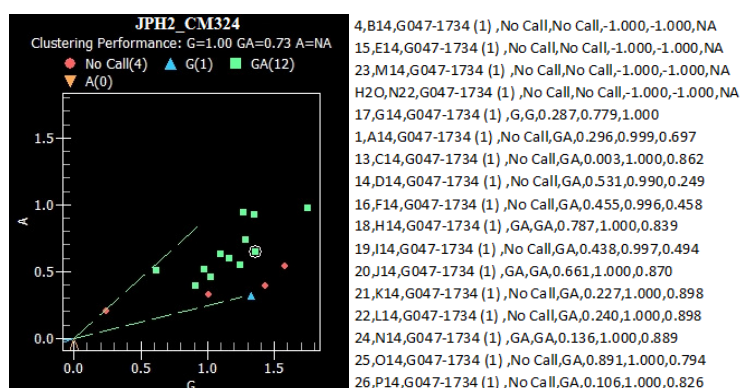


Figura 6.31 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM324 no gene *JPH2*. A Figura 6.31A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma guanina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma adenina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: alelo A; triângulos azuis: alelo G; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos G e A. A Figura 6.31B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A14 – P14).

Plex 15

O *plex* 15 é constituído por 19 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.32A e 6.32B), constatou-se que muitos dos *primers* apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em ambas as placas 1 e 2.

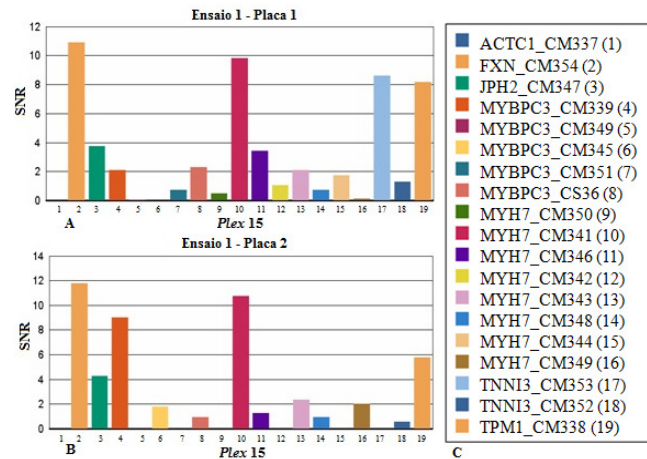


Figura 6.32 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 15 da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 19 mutações analisadas neste *plex* 15. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 19 mutações neste *plex*, constatou-se que em 13 das mutações, a extensão foi insuficiente em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas um conjunto de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Apesar da mutação CM354 (posição nº 2 na Figura 6.32) no gene *FXN*, possuir um valor de SNR elevado, de 11, apresenta um genótipo de baixa probabilidade (D) e ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.33A e 6.33B), constatou-se que o valor de extensão é reduzido, de 0,75. Existe um número elevado de amostras sem genótipo identificado, dispersas pelo gráfico, existindo 3 amostras heterozigóticas (quadrados verdes; T>C). Estes factores justificam a correcta remoção deste conjunto de *primers* do *plex*, para futura optimização.

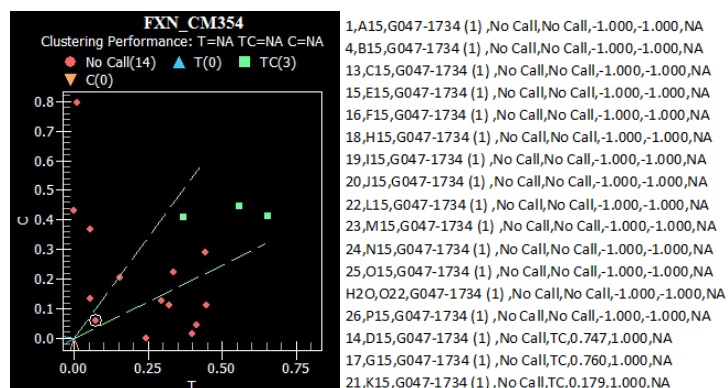


Figura 6.33 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM354 no gene *FXN*. A Figura 6.33A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma timina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma citosina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: alelo C; triângulos azuis: alelo T; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos T e C. A Figura 6.33B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A15 – P15).

Plex 16

O *plex* 16 é formado por 15 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.34A e 6.34B), constatou-se que 13 conjuntos de *primers* (excepto 2 conjuntos de *primers* em cada uma das placas) apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR no *plex*, em ambas as placas 1 e 2.

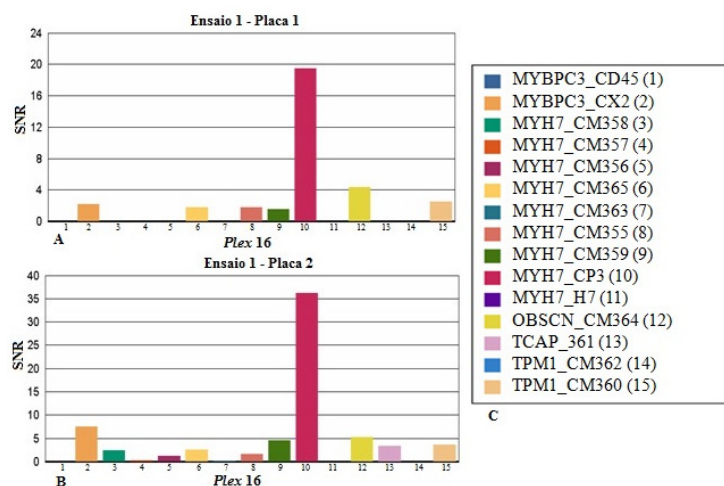


Figura 6.34 - Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 16 da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 15 mutações analisadas neste *plex* 16. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 15 mutações neste *plex*, constatou-se que em 13 mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas 2 conjuntos de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre

eles. Apesar da mutação CM362 (posição nº 14 na Figura 6.36A e 6.36B) no gene *TPM1* apresentar um valor de extensão aceitável, de 6, possui um valor de SNR nulo e o genótipo não foi identificado (sem alelos – N), logo tendo em contas estes dois dados, esta mutação foi correctamente removida do *plex*. Por outro lado, a outra mutação removida corresponde à CP3 (posição nº 10 na Figura 6.34) no gene *MYH7*, apesar de ter um valor de SNR elevado, entre 20 a 35, o seu genótipo não foi identificado (sem alelos – N) e ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.35A e 6.35B), constatou-se que o valor de extensão é bastante reduzido, de 0,6, não existindo nenhuma amostra identificada, sendo necessário repetir a genotipagem para as mutações. Estes factores justificam a correcta remoção deste conjunto de *primers* do *plex*, para futura optimização.

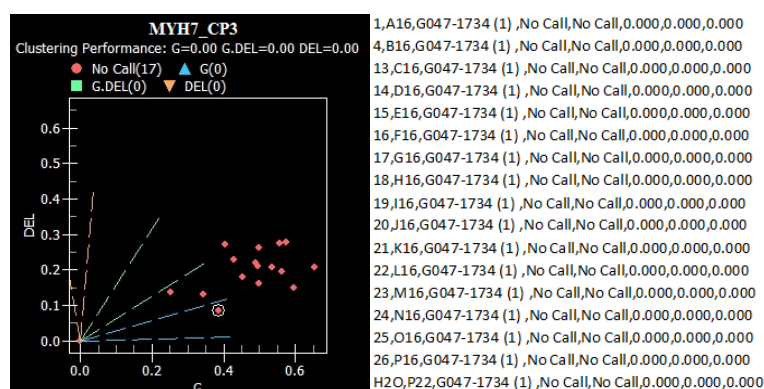


Figura 6.35 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CP3 no gene *MYH7*. A Figura 6.35A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma guanina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma delecção). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: delecção; triângulos azuis: alelo G; quadrados verdes: delecção G. A Figura 6.35B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 17 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A16 – P16).

Plex 17

O *plex* 17 é constituído por 14 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.36A e 6.36B), constatou-se que muitos dos *primers* apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em ambas as placas 1 e 2.

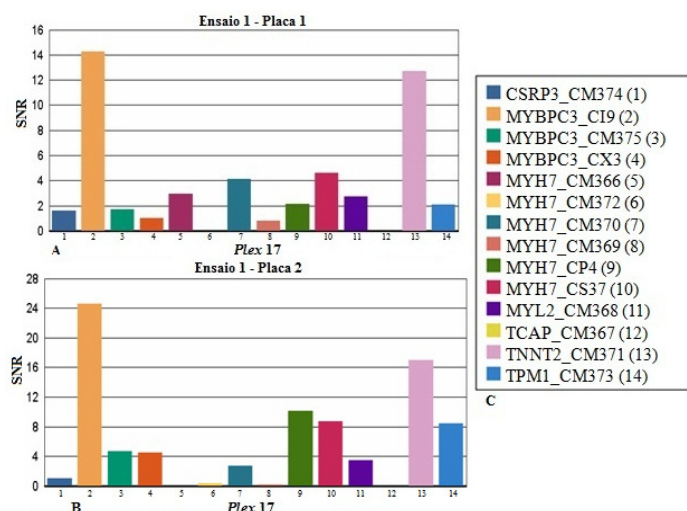


Figura 6.36 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 17 da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 14 mutações analisadas neste *plex* 17. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 14 mutações neste *plex* constatou-se que em 6 das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas um conjunto de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.37A e 6.37B) da mutação CM367 (posição nº 12 na Figura 6.36) no gene *TCAP*, verifica-se que apesar do valor de extensão ser aceitável, de 4, em 7 amostras, não foi possível identificar genótipo e tendo em conta que o genótipo atribuído a cada mutação foi agressivo (C) e que o valor de SNR é nulo, constata-se que este conjunto de *primers* foi removido correctamente do *plex*, para uma futura optimização. As restantes amostras são amostras homozigóticas (triângulos azuis; alelo CC) e heterozigóticas (quadrados verdes; C>T).

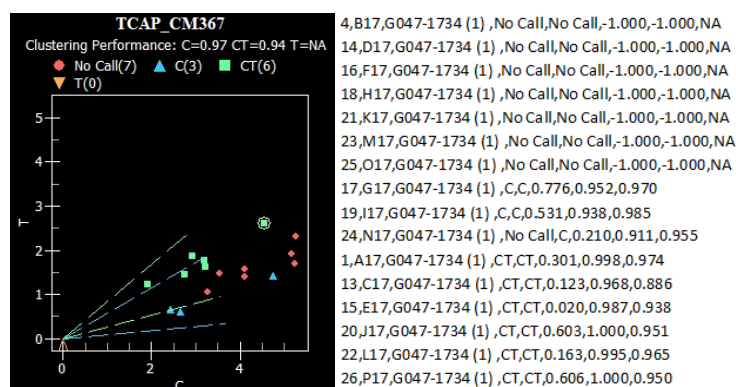


Figura 6.37 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM367 no gene *TCAP*. A Figura 6.37A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma citosina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma timina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: alelo T; triângulos azuis: alelo C; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos C e T. A Figura 6.37B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26), a respectiva localização na placa (A17 – P17).

Plex 18

O *plex* 18 é constituído por 11 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.38A e 6.38B), constatou-se que muitos dos conjuntos de *primers* apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, especialmente na placa 2.

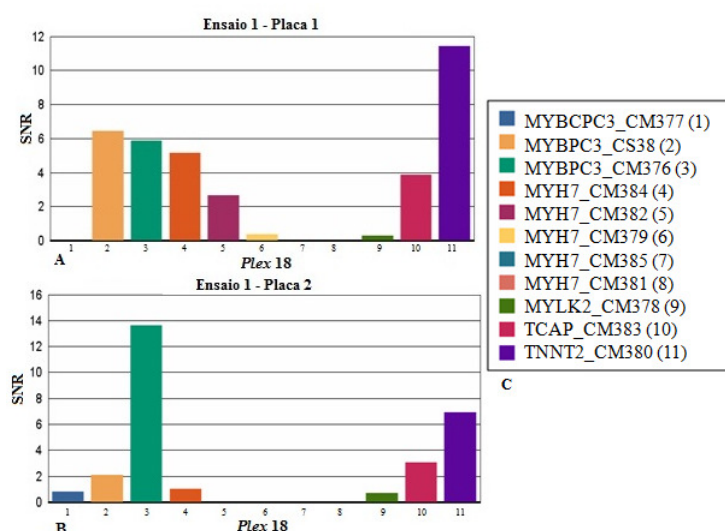


Figura 6.38 – Figura A e B - *Primer Adjustment Report* para o *plex* 18 da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 11 mutações analisadas neste *plex* 18. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 11 mutações neste *plex*, constatou-se que em 6 das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas 2 conjuntos de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Apesar da mutação CM383 (posição nº 10 na Figura 6.38) no gene *TCAP*, apresentar um valor de SNR reduzido entre 3 e 4, é necessário ter em conta que o genótipo atribuído é conservativo (A) e o valor de extensão é aceitável, de 8, considerando-se que esta mutação provavelmente deveria ter permanecido no *plex*, tendo sido a análise, realizada de um forma incorrecta pelo operador na altura do ensaio, dado que neste caso, só teve por base o valor de extensão (neste caso é aceitável) e deveria ter considerado também o genótipo atribuído. Em relação à outra mutação removida do *plex*, CM378 (posição nº 9 na Figura 6.38) no gene *MYLK2*, verificou-se que ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.39A e 6.39B), o valor de extensão é aceitável, de 4, mas apresenta um valor de SNR baixo, de 1 e um genótipo atribuído com baixa probabilidade (D), logo estes factores justificam a correcta remoção deste conjunto de *primers* para outro *plex*. Todas as amostras são homozigótica (triângulos azuis; alelo CC) encontrando-se agrupadas no gráfico.

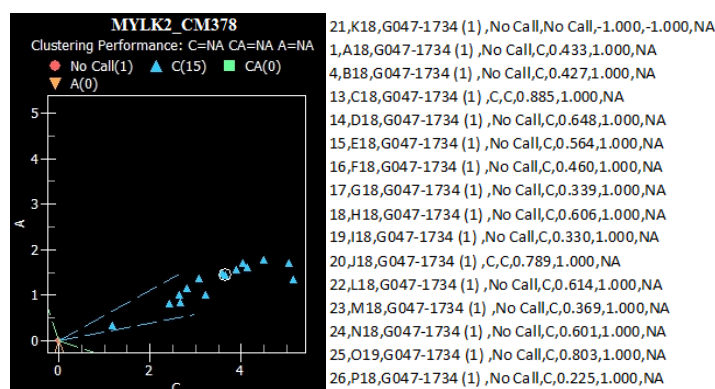


Figura 6.39 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM378 no gene *MYLK2*. A Figura 6.39A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma citosina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma adenina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: alelo A; triângulos azuis: alelo C; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos C e A. A Figura 6.39B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26), a respectiva localização na placa (A18 – P18).

Plex 19

O *plex 19* é constituído por 6 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.40A e 6.40B), constatou-se que a maioria dos conjuntos de *primers* apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em ambas as placas 1 e 2, em que apenas um conjunto de *primers* possui um valor de SNR elevado em ambas as placas, para a mutação CM386 (posição nº 5 na Figura 6.40) no gene *TNNI3*.

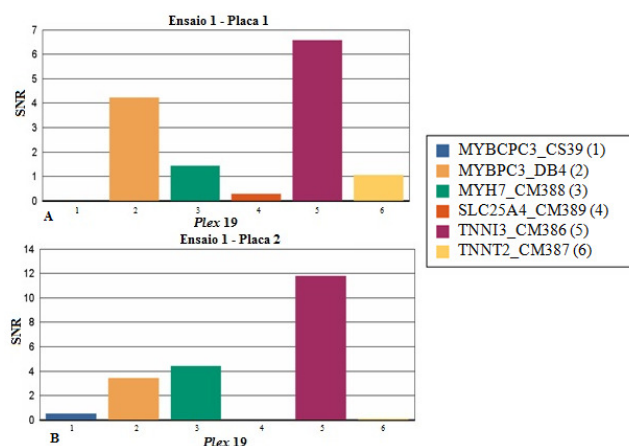


Figura 6.40 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex 19* da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 6 mutações analisadas neste *plex 19*. Na Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 6 mutações neste *plex* constatou-se que em 5 das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas 2 conjuntos de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Esta mutação DB4 (posição nº 2 na Figura 6.40) no gene *MYBPC3* foi correctamente removida deste *plex*, dado que apresenta um genótipo de baixa probabilidade (D), um valor de SNR baixo, entre 3 e 4 e um valor de extensão também baixo, de 1,0. Ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.41A e 6.41B) da mutação CM389 (posição nº 4 na Figura 6.40) do gene *SLC25A4*, constatou-se que o valor de extensão é elevado, de 15, mas por outro lado, apresenta um valor de SNR nulo e um genótipo atribuído como baixa probabilidade (D), justificando a correcta remoção deste conjunto de *primers* do *plex*. Todas as amostras são heterozigóticas (quadrados verdes; C>A), encontrando-se organizadas no gráfico.

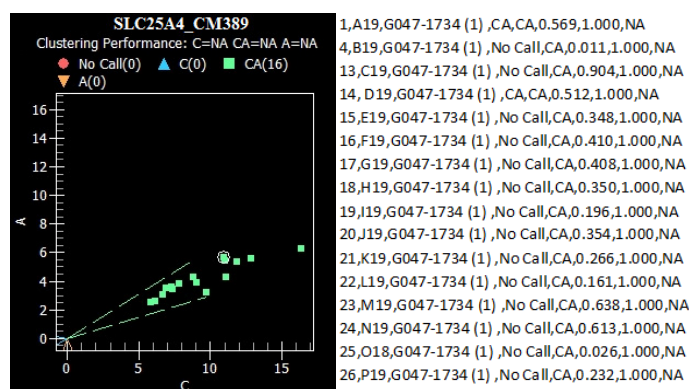


Figura 6.41 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM389 no gene *SLC25A4*. A Figura 6.41A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma citosina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma adenina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: alelo A; triângulos azuis: alelo C; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos C e A. A Figura 6.41B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26 e controlo negativo - H₂O), a respectiva localização na placa (A19 – P19).

Plex 20

O *plex 20* é constituído por 5 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1 (Figura 6.42A e 6.42B), constatou-se que maioritariamente todos os conjuntos de *primers* apresentam valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR nesse *plex*, em que existe apenas um conjunto de *primers* para a mutação CM390 (posição nº 1 na Figura 6.42) no gene *MYBPC3* com um valor de SNR elevado na placa 1.

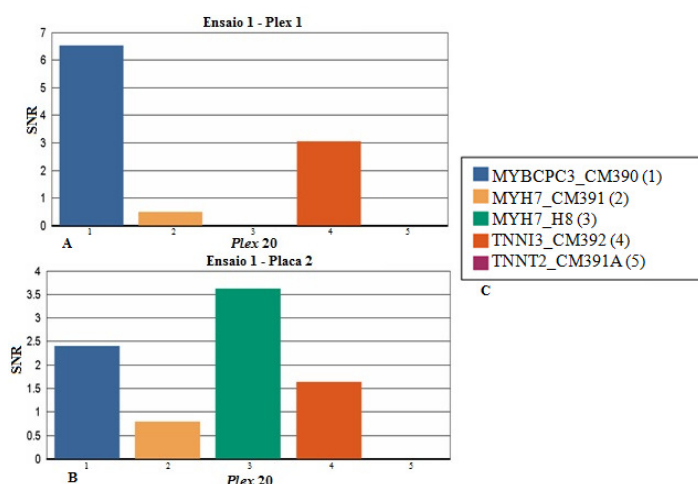


Figura 6.42 – Figura A e B - *Primer Adjustment Report* para o *plex 20* da placa 1 e 2 do Ensaio 1. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 5 mutações analisadas neste *plex 20*. Na

Figura C encontra-se a legenda da figura A e B, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A e B.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 5 mutações neste *plex*, constatou-se que em 4 das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Contudo, na altura do ensaio, o operador optou por alocar apenas um conjunto de *primers* para outro *plex*, unicamente com base no seu valor de extensão, de modo a perceber se a eficiência deste *plex* melhoraria, ao existir um menor conjunto de *primers* no *plex*, com menos interações entre eles. Ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.43^a e 6.43B) da mutação CM391A (posição nº 5 na Figura 6.42) no gene *TNNT2* verificou-se que apesar do valor de extensão ser aceitável, de 20, a análise para os restantes parâmetros justifica a correcta remoção deste conjunto de *primers* do *plex*, dado que o valor de SNR é nulo e o genótipo atribuído é agressivo (C). Todas as amostras são heterozigóticas (quadrados verdes; C>T) encontrando-se agrupadas no gráfico.

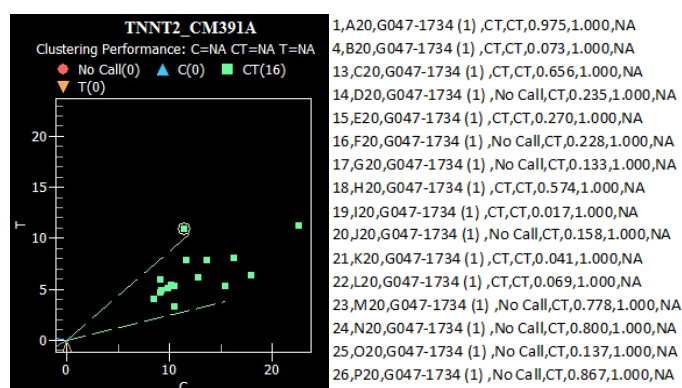


Figura 6.43 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de *primers* para a detecção da mutação CM391A no gene *TNNT2*. A Figura 6.43A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma citosina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma timina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: alelo T; triângulos azuis: alelo C; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos C e T. A Figura 6.43B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26), a respectiva localização na placa (A20 – P20).

Plex 21

O *plex 21* é constituído exclusivamente por um conjunto de *primers* referente à mutação CD46 (posição nº 1) no gene *MYBPC3* e ao analisar o valor de SNR do conjunto de *primers* das placas 1 e 2 do Ensaio 1, constatou-se que apresenta um valor de SNR diferente

das duas placas do ensaio, entre 3 e 5, mas relativamente baixo, mas um genótipo atribuído de conservativo (A) em ambas as placas. Ao analisar o *Call Cluster Plot* (Figura 6.44A e 6.44B), constatou-se que o valor de extensão é elevado, de 30 e tendo em consideração que é a única mutação no *plex*, na altura do ensaio, o operador optou por manter esta mutação no *plex*. Num ensaio futuro, apenas será necessário otimizar o valor de SNR. Todas as amostras são heterozigóticas (quadrados verdes; C>T), encontrando-se agrupadas no eixo dos alelos de massa elevada.

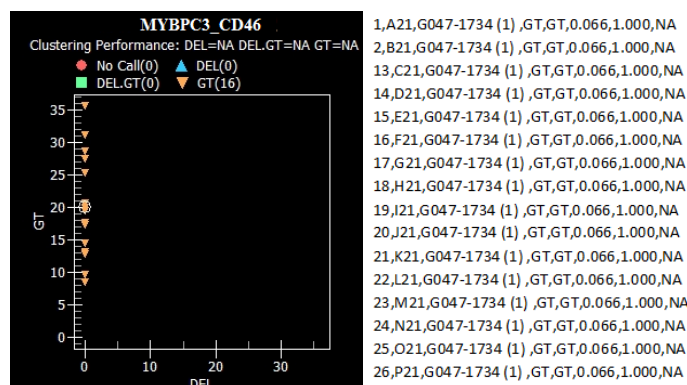


Figura 6.44 – Gráfico gerado pela ferramenta *Call Cluster Plot* para o conjunto de primers para a detecção da mutação CM391A no gene *TNNT2*. A Figura 6.44A representa o *Call Cluster Plot*, em que o eixo das abcissas representa o alelo com a massa mais baixa (neste caso uma citosina) e o eixo das ordenadas contém o alelo com a massa mais elevada (neste caso uma timina). Legenda: círculos a vermelho: *no calls* (H₂O); triângulos laranjas invertidos: alelo T; triângulos azuis: alelo C; quadrados verdes: amostras com ambos os alelos C e T. A Figura 6.44B apresenta o *Call Cluster Results*, em que se pode verificar o resultado de genotipagem para as 16 amostras testadas (DNAs com numeração de 1 a 26), a respectiva localização na placa (A20 – P20).

Ao analisar os 21 *plexes* que constituem o Ensaio 1 e tendo por base os três parâmetros: o valor do SNR, o valor da extensão e o genótipo atribuído a cada uma das mutações, concluiu-se que das 72 mutações removidas (Tabela 6.3), 6 delas foram incorrectamente retiradas do *plex* de origem. A análise efectuada pelo operador nestas 6 mutações foi incorrecta, dado que teve por base unicamente o valor de extensão de cada uma das mutações, ficando por analisar os restantes dois parâmetros, que neste caso iriam influenciar os resultados.

Em relação às restantes 66 mutações, todas elas foram correctamente removidas do *plex* de origem. Alguns dos conjuntos de primers removidos dos *plexes* 1 a 20 foram alocados nos *plexes* 22 a 31 no Ensaio 2.

Tabela 6.3 – Resultados do Ensaio 1, com base nos parâmetros: valor do SNR, valor de extensão e genótipo atribuído a cada uma das mutações alocadas para outro *plex*.

Mutação	Parâmetros			Comentário
	Valor do SNR*	Valor da extensão	Genótipo	
Plex 1				
TNNI3_CM6	5 e e 9	0,1	Agressivo	Corectamente retirado
MTCYB_G1	6	0,5	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
MYBPC3_CM18	0	1,0	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
MYBPC3_CM3	15	0,05	Sem alelos	Correctamente retirado
MYBPC3_CS3	10 e 9	0,10	Sem alelos	Corectamente retirado
TPM1_CM19	12 e 11	0,10	Sem alelos	Correctamente retirado
MYBPC3_CM394	1 e 17	0,03	Sem alelos	Corectamente retirado
MYH6_CM15	0 e 1	0,02	Sem alelos	Correctamente retirado
PRKAG2_C11	1 e 2	0,06	Sem alelos	Correctamente retirado
MYBPC3_CD6	0	0,3	Moderado	Correctamente retirado
TPM1_CM20	3	0,3	Moderado	Correctamente retirado
MYBPC3_CS4	0 e 1	0,2	Moderado	Correctamente retirado
MYH7_CM7	2 e 3	0,3	Conservativo	Corectamente retirado
Plex 2				
MYBPC3_CM41	7 e 10	0,2	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
TNNI3_CM25	14 e 8	0,2	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
MYH7_CM42	19	0,2	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
MYBPC3_C13	1	0,3	Sem alelos	Correctamente retirado
MYBPC3_CM47	6	0,04	Sem alelos	Correctamente retirado
MYBPC3_CS6	14 e 10	1,0	Sem alelos	Correctamente retirado
TNNT2_CM28	6 e 13	0,05	Sem alelos	Correctamente retirado
MYH7_CM21	6 e 14	0,3		
Plex 3				
MYL2_CM65	2 e 0	0,4	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
MYBPC3_CM61	5 e 0	1,5	Sem alelos	Correctamente retirado
MYO6_CM71	2 e 0	0,2	Sem alelos	Correctamente retirado
MYH7_CM72	5	0,10	Sem alelos	Correctamente retirado
TNNI3_CM73	5	1,6	Sem alelos	Correctamente retirado
MYBPC3_CS10	1	4	Conservativo	Incorrectamente retirado
Plex 4				
MYBPC3_CM91	5	1,5	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
MYH7_CM89	6 e 10	0,03	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
MYBPC3_CD11	5 e 6	1,0	Sem alelos	Correctamente retirado
MYBPC3_CD10	1	1,0	Sem alelos	Correctamente retirado

<i>MYBPC3_CM90</i>	0	1,8	Conservativo	Correctamente retirado
<i>MYH7_CM98</i>	2	0,2	Conservativo	Correctamente retirado
<i>Plex 5</i>				
<i>MYBPC3_CS18</i>	1	0,2	Sem alelos	Correctamente retirado
<i>MYBPC3_CM108</i>	2	0,8	Sem alelos	Correctamente retirado
<i>MYBPC3_CM123</i>	4 e 6	0,3	Sem alelos	Correctamente retirado
<i>TNNT2_CM124</i>	4 e 7	0,6	Moderado	Correctamente retirado
<i>Plex 6</i>				
<i>MYH7_CM161</i>	4 e 1	0,4	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
<i>MYLK2_CM139</i>	10 e 6	2,5	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
<i>TNNT2_CM145</i>	12 e 14	0,6	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
<i>PRKAG2_CM157</i>	5 e 4	0,8	Sem alelos	Correctamente retirado
<i>MYL3_CM140</i>	5 e 10	0,8	Sem alelos	Correctamente retirado
<i>MYH7_CM163</i>	0	0,3	Conservativo	Correctamente retirado
<i>MYH7_CM161</i>	0	0,4	Conservativo	Correctamente retirado
<i>Plex 7</i>				
<i>MYBPC3_CM170</i>	0 e 1	0,7	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
<i>MYH7_CM175</i>	1 e 5	1,5	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
<i>MYBPC3_CS22</i>	10	2,0	Agressivo	Correctamente retirado
<i>Plex 8</i>				
<i>MYBPC3_CM204</i>	3	0,3	Agressivo	Correctamente retirado
<i>MYH7_H4</i>	3	1,0	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
<i>MYBPC3_CM196</i>	5	1,5	Sem alelos	Correctamente retirado
<i>JPH2_CM195</i>	6	1,5	Conservativo	Incorrectamente retirado
<i>TNNT2_CM205</i>	3	5	Conservativo	Incorrectamente retirado
<i>Plex 9</i>				
<i>JPH2_CM240</i>	6	0,4	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
<i>MYBPC3_CD28</i>	2	1,0	Conservativo	Correctamente retirado
<i>Plex 10</i>				
<i>DES_CM246</i>	14 e 16	1,4	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
<i>MYBPC3_CS29</i>	3	3	Sem alelos	Correctamente retirado
<i>Plex 11</i>				
<i>MYBPC3_CI7</i>	3	10 e 15	Conservativo	Incorrectamente retirado
<i>Plex 12</i>				
<i>MYH7_CM290</i>	4	2,0	Sem alelos	Correctamente retirado
<i>MYL2_CM295</i>	2	1,0	Conservativo	Correctamente retirado
<i>MYH7_CM281</i>	0	1,0	Moderado	Correctamente retirado
<i>Plex 13</i>				
<i>MYH7_CM302</i>	4 e 14	2	Baixa probabilidade	Incorrectamente retirado

Plex 14				
<i>JPH2_CM324</i>	14	1,5	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
Plex 15				
<i>FXN_CM354</i>	11	0,75	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
Plex 16				
<i>MYH7_CP3</i>	20 e 35	0,6	Sem alelos	Correctamente retirado
<i>TPM1_CM362</i>	0	0,6	Sem alelos	Correctamente retirado
Plex 17				
<i>TCAP_CM367</i>	0	4	Agressivo	Correctamente retirado
Plex 18				
<i>MYLK2_CM378</i>	1	4	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
<i>TCAP_CM383</i>	4 e 3	8	Conservativo	Incorrectamente retirado
Plex 19				
<i>SLC25A4_CM389</i>	0	15	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
<i>MYBPC3_DB04</i>	3 e 4	1,0	Baixa probabilidade	Correctamente retirado
Plex 20				
<i>TNNT2_CM391A</i>	0	20	Agressivo	Correctamente retirado

*Valor da placa 1 e 2 do Ensaio 1

6.2.4 Ensaio 2

Ao analisar os resultados do Ensaio 1, verificou-se que nem todos os conjuntos de *primers* apresentaram valores de amplificação ou extensão adequados e mesmo em alguns destes, a significância estatística atribuída não era a esperada. Por esta razão e com o objectivo de otimizar cada um dos *plexes*, o operador na altura do ensaio resolveu retirar os 72 conjuntos de *primers*, tendo por base unicamente o valor de extensão de cada uma das mutações, alocando algumas destas mutações, do *plex* 22 ao 31. Na Tabela 6.3 encontram-se listados os 72 conjuntos de *primers* removidos dos *plexes* de origem do Ensaio 1, bem como a sua avaliação em cada um dos parâmetros analisados: valor de extensão, valor do SNR e o genótipo atribuído a cada mutação e se foram correctamente ou incorrectamente retirados.

Com a remoção de 72 mutações, os *plexes* 1 a 20, passam a ser constituídos por um menor número de conjuntos de *primers*, podendo ocorrer uma optimização de cada *plex*, dado que ao existirem um menor número de *primers* por *plex*, evita-se a combinação de *primers* e de produtos de extensão que possam resultar na formação de dímeros de *primers* e numa hibridação não específica dos oligonucleótidos (Sequenom®). Os *plexes* 22 a 31 são constituídos pelos conjuntos de *primers* removidos dos *plexes* 1 a 20, permitindo a amplificação de regiões específicas dos genes *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNI3*, *TNNT2*, *PRKAG2*,

TPM1, *MYL2*, *TCAP*, *MYO6*, *MYH6* e *MTCYB*. O Ensaio 2 formado por 31 *plexes*, foi testados em 5 placas (Placas 3, 5, 6, 9 e 10).

Na Tabela 6.4 encontram-se listados os conjuntos de *primers* removidos e alocados noutros *plexes* e aqueles que simplesmente foram removidos, após a análise do Ensaio 1, tendo ocorrido a reorganização da placa, de modo a testar nova optimização das 541 mutações.

Tabela 6.4 – Lista dos conjuntos de *primers* removidos após análise do Ensaio 1, constituído por 21 *plexes* para o Ensaio 2, constituído por 31 *plexes*

Mutação	Ensaio 1	Mutação	Ensaio 1	Mutação	Ensaio 1
<i>MTCYB_G1</i>	<i>plex 1</i>	<i>MYH7_CM72</i>	<i>plex 3</i>	<i>JPH2_CM195</i>	<i>plex 8</i>
<i>MYBPC3_CD6</i>	<i>plex 1</i>	<i>MYL2_CM65</i>	<i>plex 3</i>	<i>MYBPC3_CM196</i>	<i>plex 8</i>
<i>MYBPC3_CM18</i>	<i>plex 1</i>	<i>MYO6_CM71</i>	<i>plex 3</i>	<i>MYBPC3_CM204</i>	<i>plex 8</i>
<i>MYBPC3_CM3</i>	<i>plex 1</i>	<i>TNNI3_CM73</i>	<i>plex 3</i>	<i>MYH7_H4</i>	<i>plex 8</i>
<i>MYBPC3_CM394</i>	<i>plex 1</i>	<i>MYBPC3_CD11</i>	<i>plex 4</i>	<i>TNNT2_CM205</i>	<i>plex 8</i>
<i>MYBPC3_CS3</i>	<i>plex 1</i>	<i>MYBPC3_CD10</i>	<i>plex 4</i>	<i>JPH2_CM240</i>	<i>plex 9</i>
<i>MYBPC3_CS4</i>	<i>plex 1</i>	<i>MYBPC3_CM90</i>	<i>plex 4</i>	<i>MYBPC3_CD28</i>	<i>plex 9</i>
<i>MYH6_CM15</i>	<i>plex 1</i>	<i>MYBPC3_CM91</i>	<i>plex 4</i>	<i>DES_CM246</i>	<i>plex 10</i>
<i>MYH7_CM7</i>	<i>plex 1</i>	<i>MYH7_CM89</i>	<i>plex 4</i>	<i>MYBPC3_CS20</i>	<i>plex 10</i>
<i>PRKAG2_C11</i>	<i>plex 1</i>	<i>MYH7_CM98</i>	<i>plex 4</i>	<i>MYBPC3_C17</i>	<i>plex 11</i>
<i>TNNI3_CM6</i>	<i>plex 1</i>	<i>MYBPC3_CM108</i>	<i>plex 5</i>	<i>MYH7_CM290</i>	<i>plex 12</i>
<i>TPM1_CM19</i>	<i>plex 1</i>	<i>MYBPC3_CM123</i>	<i>plex 5</i>	<i>MYL2_CM295</i>	<i>plex 12</i>
<i>TPM1_CM20</i>	<i>plex 1</i>	<i>MYBPC3_CS18</i>	<i>plex 5</i>	<i>MYH7_CM281</i>	<i>plex 12</i>
<i>MYBPC3_C13</i>	<i>plex 2</i>	<i>TNNT2_CM124</i>	<i>plex 5</i>	<i>MYH7_CM302</i>	<i>plex 13</i>
<i>MYBPC3_CM47</i>	<i>plex 2</i>	<i>MYH7_CM141</i>	<i>plex 6</i>	<i>JPH2_CM324</i>	<i>plex 14</i>
<i>MYBPC3_CM41</i>	<i>plex 2</i>	<i>MYH7_CM163</i>	<i>plex 6</i>	<i>FXN_CM354</i>	<i>plex 15</i>
<i>MYBPC3_CS6</i>	<i>plex 2</i>	<i>MYH7_CM161</i>	<i>plex 6</i>	<i>MYH7_CP3</i>	<i>plex 16</i>
<i>MYH7_CM21</i>	<i>plex 2</i>	<i>MYL3_CM140</i>	<i>plex 6</i>	<i>TPM1_CM362</i>	<i>plex 16</i>
<i>MYH7_CM42</i>	<i>plex 2</i>	<i>MYLK2_CM139</i>	<i>plex 6</i>	<i>TCAP_CM367</i>	<i>plex 17</i>
<i>TNNI3_CM25</i>	<i>plex 2</i>	<i>PRKAG2_CM157</i>	<i>plex 6</i>	<i>MYLK2_CM378</i>	<i>plex 18</i>
<i>TNNT2_CM28</i>	<i>plex 2</i>	<i>TNNT2_CM145</i>	<i>plex 6</i>	<i>TCAP_CM383</i>	<i>plex 18</i>
<i>MYBPC3_CM61</i>	<i>plex 3</i>	<i>MYBPC3_CM170</i>	<i>plex 7</i>	<i>SLC25A4_CM389</i>	<i>plex 19</i>
<i>MYBPC3_CS10</i>	<i>plex 3</i>	<i>MYBPC3_CS22</i>	<i>plex 7</i>	<i>MYBPC3_DB04</i>	<i>plex 19</i>
<i>MYH7_CM68</i>	<i>plex 3</i>	<i>MYH7_CM175</i>	<i>plex 7</i>	<i>TNNT2_CM391A</i>	<i>plex 20</i>

A Figura 6.45 representa o novo desenho do *Spectrochip* para o Ensaio 2, já com a reorganização para os 31 *plexes*. Também neste ensaio, os *plexes* foram distribuídos nas placas de 384 poços por colunas e identificados pela numeração (1 a 31) (cada um com a respectiva coloração). Em cada placa foram testados 10 amostras de DNA, distribuídas por linhas (linhas B a P), de modo a serem testadas para todos os *plexes*. Na primeira linha de cada placa (linha A), foi adicionado um controlo negativo de reacção, água bi-destilada estéril. Uma das amostras de DNA utilizada (linha B) correspondia a uma amostra utilizada como controlo negativo de mutações (amostra genotipada por sequenciação e sem mutações associadas à MH).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
J	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
L	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Q	25	26	27	28	29	30	31	25	26	27	28	29	30	31	25	26	27	28	29	30	31			
R	25	26	27	28	29	30	31	25	26	27	28	29	30	31	25	26	27	28	29	30	31			
S	25	26	27	28	29	30	31	25	26	27	28	29	30	31	25	26	27	28	29	30				
T	25	26	27	28	29	30	31	25	26	27	28	29	30	31	25	26	27	28	29	30				

Figura 6.45 – Organização da placa de *iPLEXMassARRAY* com 31 *plexes* no Ensaio 2. Os *plexes* foram distribuídos por colunas, sendo identificados pela numeração (1 a 31) e pela respectiva coloração e as amostras de DNA distribuídas por linhas (linhas B a P). Na linha B encontra-se uma amostra de DNA sem mutações e na linha A encontra-se a amostra de controlo negativo (água bi-destilada estéril). Por exemplo, a amostra de DNA que se encontra evidenciada foi adicionada na linha E e também na linha M, de forma a que cada DNA fosse avaliado para cada um dos 31 *plexes*.

À semelhança do Ensaio 1, a análise dos valores de SNR e da significância estatística, de cada um dos conjuntos de *primers* relativos às 541 mutações e o facto de poderem ser retiradas mutações em vários *plexes*, foi realizada com base nos relatórios *Primer Adjustment Report* e *Plate Result Report*. Este primeiro relatório tem em conta a relação inversamente proporcional entre a massa de cada analito e o seu valor de SNR. Idealmente, os valores de SNR de todos os *primers* devem ser ajustados a valores equivalentes para garantir o sucesso na reacção de extensão da mutação. O relatório *Plate Result Report* fornece a descrição pormenorizada dos resultados de genotipagem, tendo em conta uma classificação baseada na significância estatística do alelo identificado (A – conservativo; B- Moderado; C-

Agressivo; N- sem alelo; D- baixa probabilidade; E- genótipo atribuído pelo operador). Idealmente os resultados deveriam ser A ou B.

Plex 1

Após a remoção de 13 conjuntos de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 1 passou a ser constituído por 24 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.46A e 6.46B) constatou-se que ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuíram as interações entre eles, o que se traduziu numa diminuição dos conjuntos de *primers* para 6, com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR e a necessitar de optimização.

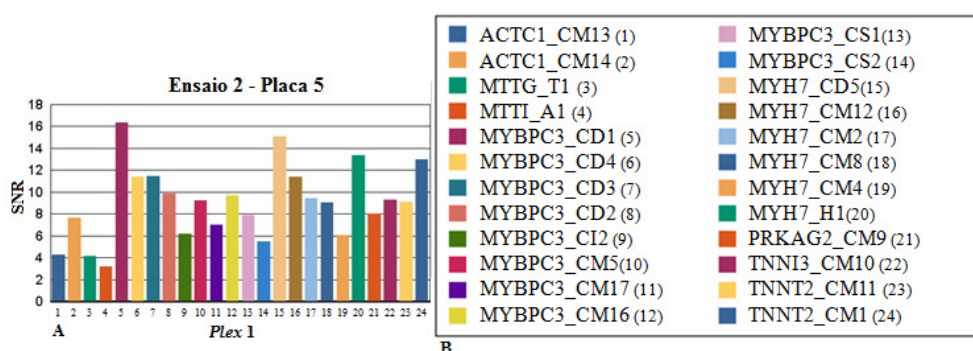


Figura 6.46 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 1 da Placa 5 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 24 mutações analisadas neste *plex* 1. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 24 mutações do *plex* 1 do Ensaio 2 (Anexo 1), constatou-se que ainda existem 7 mutações, em que a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Em relação às mutações CM13 (posição nº 1 na Figura 6.46) e CM14 (posição nº 2 na Figura 6.46) no gene *ACTC1* e CD1 (posição nº 5 na Figura 6.46) e CS2 (posição nº 14 na Figura 6.46) no gene *MYBPC3*, constatou-se que estas apresentaram uma optimização no valor de SNR, de 2, 2, 1 e 1 para 4, 12, 16 e 6, respectivamente e no valor de extensão que era praticamente nulo (nas 4 mutações) para 6, 3,4, 6 e 5, respectivamente, mas continuam a apresentar um genótipo atribuído de baixa probabilidade (D). As outras 3 mutações, T1 (posição nº 3 na Figura 6.46) no gene *MTTG*, CD4 (posição nº 6 na Figura 6.46) no gene *MYBPC3* e A1 (posição nº 4 na Figura 6.46) no gene *MTTI* continuaram a não apresentar genótipo (sem alelos – N), um valor de extensão reduzido de 0,6, 1,2 e 0,6 respectivamente, contudo apresentam um valor de SNR de 4, 8 e 4, respectivamente. Provavelmente, todas

estas mutações deveriam ter sido retiradas do *plex* pelo operador aquando a optimização, dado que este analisou unicamente o valor de extensão de cada mutação, ignorando o valor do SNR e o genótipo atribuído a cada mutação.

Plex 2

Após a remoção de 8 conjuntos de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 2 passou a ser constituído por 29 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.47A e 6.47B) constatou-se que apesar da redução do número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuindo as interações entre eles, continuou a existir um número razoável de conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR e a necessitar de optimização.

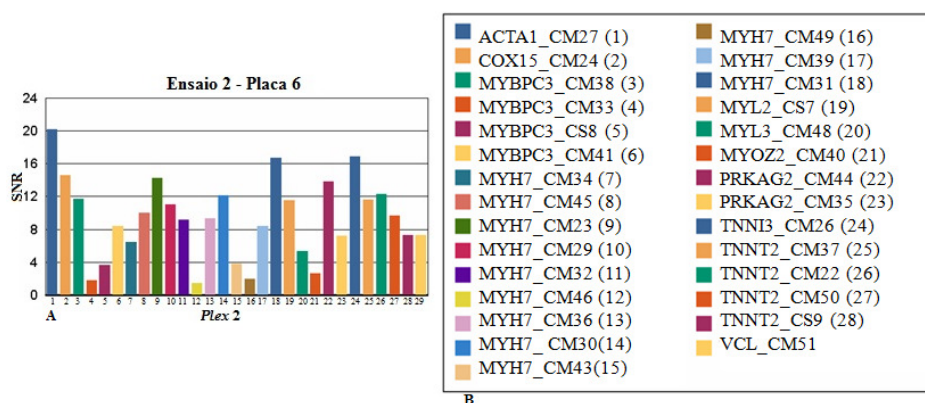


Figura 6.47 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 2 da Placa 6 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 29 mutações analisadas neste *plex* 2. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 29 mutações do *plex* 2 do Ensaio 2 (Anexo 3), constatou-se que ainda existem 9 mutações, em que a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Apesar das mutações CM38 (posição nº 3 na Figura 6.47) e CM33 (posição nº 4 na Figura 6.47) no gene *MYBPC3*; CM34 (posição nº 7 na Figura 6.47) e CM43 (posição nº 15 na Figura 6.47) no gene *MYH7* e CM26 (posição nº 24 na Figura 6.47) no gene *TNNI3* terem melhorado face ao valor de SNR, de valores nulos (nas 5 mutações) para valores 4, 2, 2, 2 e 2, respectivamente, os valores de extensão mantiveram-se baixos em 3,0; 2,0; 1,0; 1,4 e 2 e continuou a não se conseguir identificar o genótipo atribuído a cada mutação (sem alelos – N). Para as restantes 4 mutações CM46 (posição nº 12 na Figura 6.47), e CM49 (posição nº 16 na Figura 6.47) no gene *MYH7*; CS8 (posição nº 5 na Figura 6.47) no gene *MYBPC3* e CM40

(posição nº 21 na Figura 6.47) no gene *MYOZ2* os valores de extensão mantiveram-se bastante reduzidos, com o valor de 1, o valor de SNR manteve-se a 2 e 1 e o genótipo atribuído foi de baixa probabilidade (D). Com estes resultados, constatou-se que apesar de terem sido removidos 8 conjuntos de *primers*, deveria-se ter removido um maior número de mutações aquando a optimização pelo operador, dado que este analisou unicamente o valor de extensão de cada mutação, ignorando o valor do SNR e o genótipo atribuído a cada mutação, continuando a existir um número elevado de mutações por optimizar, não tendo ocorrido nenhuma optimização relevante.

Plex 3

Após a remoção de 7 conjuntos de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 3 passou a ser constituído por 30 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.49A e 6.49B) constatou-se que apesar da redução do número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuindo as interacções entre eles, continuou a existir um número elevado de conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR e a necessitar de optimização.

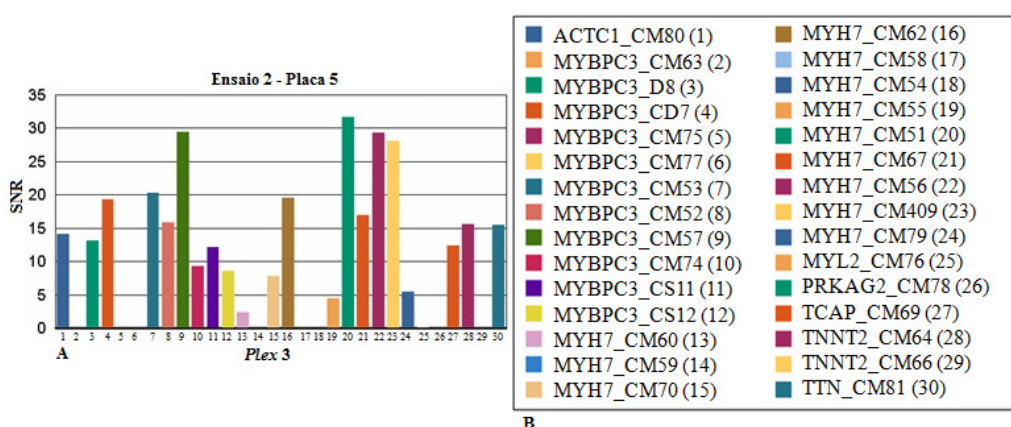


Figura 6.48 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 3 da Placa 5 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 30 mutações analisadas neste *plex* 3. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 30 mutações do *plex* 3 do Ensaio 2 (Anexo 5), constatou-se que ainda existem 11 mutações, em que a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Ao verificar os valores de SNR e de extensão das mutações CS12 (posição nº 12 na Figura 6.48), CM63 (posição nº 2 na Figura 6.48), CM75 (posição nº 5 na Figura 6.48), CM77 (posição nº 6 na Figura 6.48) e gene *MYBPC3*; CM79 (posição nº 24 na Figura 6.48), CM60

(posição nº 13 na Figura 6.48), CM59 (posição nº 14 na Figura 6.48), CM58 (posição nº 17 na Figura 6.48) e CM54 (posição nº 18 na Figura 6.48) no gene *MYH7*; CM78 (posição nº 26 na Figura 6.48) no gene *PRKAG2* e CM66 (posição nº 29 na Figura 6.48) no gene *TNNT2* constatou-se que não ocorreu nenhuma otimização, dado que os valores de SNR mantiveram-se nulos em praticamente todas as mutações e os valores de extensão não excederam o valor de 1,0, continuando-se a não conseguir identificar o genótipo (sem alelos – N). Tendo em conta estes resultados e apesar de terem sido removidos 7 conjuntos de *primers*, este *plex* continua a apresentar um elevado número de mutações por otimizar, o que pode indicar que aquando a otimização pelo operador, deveria-se ter retirado um maior número de mutações, não tendo em conta unicamente o valor de extensão de cada uma, mas sim os três parâmetros correlacionados. Pode-se concluir que esta otimização não foi relevante.

Plex 4

Após a remoção de 6 conjuntos de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 4 passou a ser constituído por 31 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.49A e 6.49B) constatou-se que ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuíram as interacções entre eles, o que se traduziu numa diminuição dos conjuntos de *primers* para 7, com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR e a necessitar de otimização.

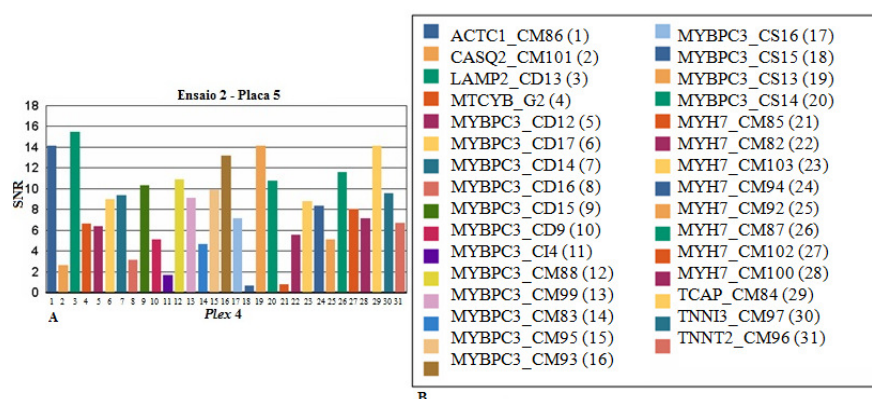


Figura 6.49 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 4 da Placa 5 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 31 mutações analisadas neste *plex* 4. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 31 mutações do *plex* 4 do Ensaio 2 (Anexo 7), constatou-se que ainda existem 7 mutações, em

que a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Ao analisar as mutações CD16 (posição nº 8 na Figura 6.49) no gene *MYBPC3*; CM94 (posição nº 24 na Figura 6.49), CM100 (posição nº 28 na Figura 6.49) e CM92 (posição nº 25 na Figura 6.49) no gene *MYH7* e CM97 (posição nº 30 na Figura 6.49) no gene *TNNI3* constatou-se que ocorreu uma otimização em relação ao valor de SNR, de 1 (em todas as mutações) para 3 e ao genótipo atribuído a cada uma das mutações de moderado (B). Contudo o valor de extensão continua reduzido andando entre valores de 0,3 e 1,4. Para as restantes duas mutações CM101 (posição nº 2 na Figura 6.49) no gene *CASQ2* com um genótipo de baixa probabilidade (D) e CS15 (posição nº 18 na Figura 6.49) no gene *MYBPC3* sem qualquer genótipo identificado (sem alelos – N), quer o valor de SNR piorou, de 5 e 6 para 1 e 2, respetivamente, como o valor de extensão continuou reduzido nos 0,4. Provavelmente, algumas estas mutações deveriam ter sido retiradas do *plex* pelo operador aquando a optimização, dado que este analisou unicamente o valor de extensão de cada mutação, ignorando o valor do SNR e o genótipo atribuído a cada mutação.

Plex 5

Após a remoção de 4 conjuntos de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 5 passou a ser constituído por 33 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.50A e 6.50B) constatou-se que ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuíram as interações entre eles, o que se traduziu numa diminuição dos conjuntos de *primers* para 7, com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR e a necessitar de optimização.

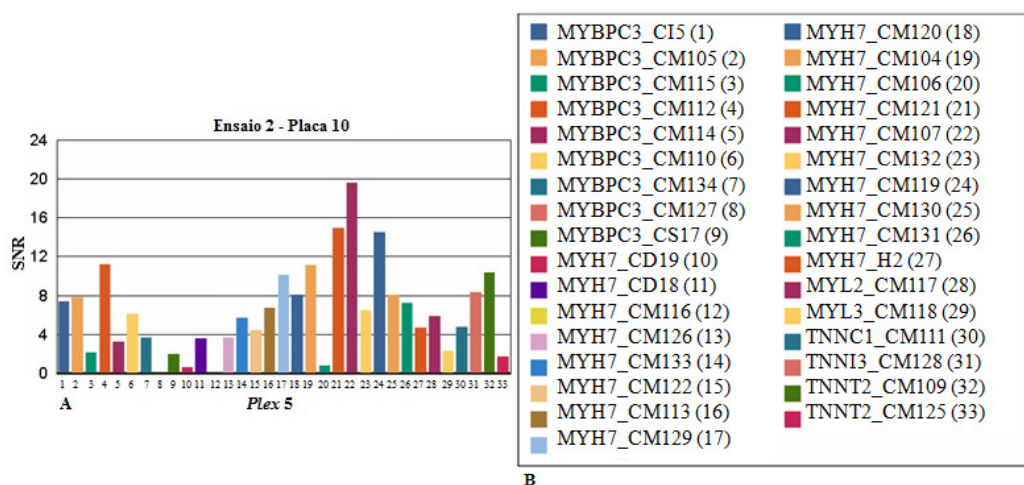


Figura 6.50 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 5 da Placa 10 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 33 mutações analisadas neste *plex* 5. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 33 mutações do *plex 5* do Ensaio 2 (Anexo 9), constatou-se que ainda existem 9 mutações, em que a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Ao analisar as mutações CS17 (posição nº 9 na Figura 6.50) e CM115 (posição nº 3 na Figura 6.50) no gene *MYBPC3*; CM116 (posição nº 12 na Figura 6.50), CM126 (posição nº 13 na Figura 6.50) e CM122 (posição nº 15 na Figura 6.50) gene *MYH7*, constatou-se que o valor de SNR e o de extensão destas manteve-se constante aquando a optimização, entre os valores 2 e 3 e 0,7 e 1,0, respectivamente, contudo para estas mutações não foi possível a identificação do genótipo (sem alelos – N). Em relação às outras mutações CD19 (posição nº 10 na Figura 6.50) e CM132 (posição nº 23 na Figura 6.50) no gene *MYH7*; CM125 (posição nº 33 na Figura 6.50) no gene *TNNT2* e CM127 (posição nº 8 na Figura 6.50) no gene *MYBPC3*, constatou-se que tanto o valor de SNR como o de extensão piorou, de 4 para 0 e 2 e 1,5 para 0,7 e 0,8, respectivamente, enquanto o genótipo continua sem identificação (sem alelos – N). Provavelmente, algumas destas mutações deveriam ter sido retiradas do *plex* pelo operador aquando a optimização, dado que este analisou unicamente o valor de extensão de cada mutação, ignorando o valor do SNR e o genótipo atribuído a cada mutação.

Plex 6

Após a remoção de 7 conjuntos de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex 6* passou a ser constituído por 28 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.51A e 6.51B) constatou-se que mesmo ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuindo as interações entre eles, neste caso, o número de conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR aumentou, dado só existirem 4 conjuntos de *primers* com um valor de SNR, extensão e de significancia estatistica aceitável.

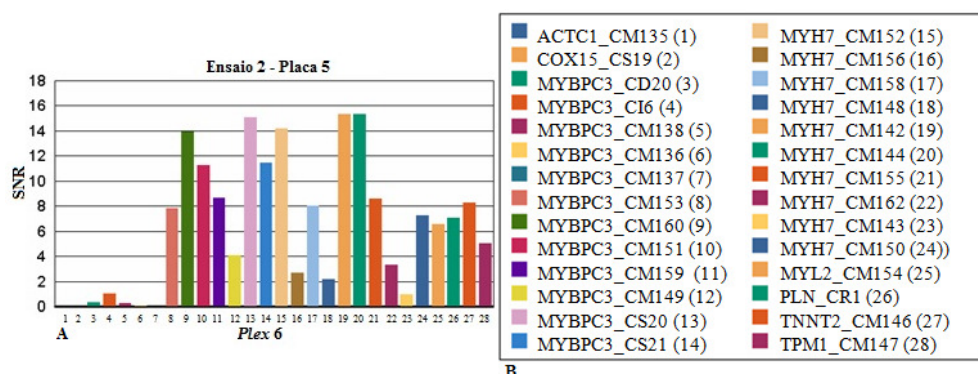


Figura 6.51 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex* 6 da Placa 5 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 28 mutações analisadas neste *plex* 6. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 28 mutações do *plex* 6 do Ensaio 2 (Anexo 11), constatou-se que em 24 mutações neste *plex*, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Apesar de ter ocorrido a remoção de 9 mutações por parte do operador, com o objectivo de otimizar o *plex*, em todos os 3 parametros analisados, valor de SNR, extensão e genótipo atribuído a cada uma das mutações, constatou-se não ocorreu nenhuma melhoria face ao Ensaio 1, necessitando de otimizar este *plex* no seu todo.

Plex 7

Após a remoção de 3 conjuntos de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 7 passou a ser constituído por 30 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.52A e 6.52B) constatou-se que ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuíram as interacções entre eles, o que se traduziu numa diminuição dos conjuntos de *primers* para 5, com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR e a necessitar de optimização.

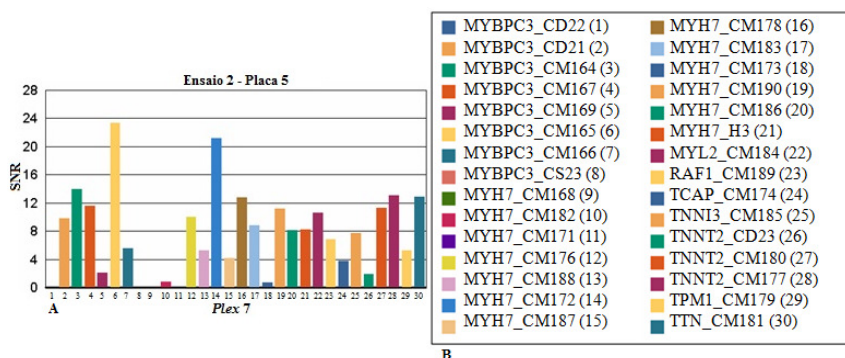


Figura 6.52 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex* 7 da Placa 5 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 30 mutações analisadas neste *plex* 7. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 30 mutações do *plex* 7 do Ensaio 2 (Anexo 13), constatou-se que ainda existem 5 mutações, em que a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Ao analisar as mutações CM174 (posição nº 24 na Figura 6.52) no gene *TCAP*;

CM169 (posição nº 5 na Figura 6.52) no gene *MYBPC3* e CM182 (posição nº 10 na Figura 6.52) no gene *MYH7*, sem genótipo identificado (sem alelos – N); CM171 (posição nº 11 na Figura 6.52) no gene *MYH7* com genótipo agressivo (C); CD22 (posição nº 1 na Figura 6.52) e CS23 (posição nº 8 na Figura 6.52) no gene *MYBPC3* com um genótipo conservativo (A), quanto ao valor de extensão, constatou-se que se manteve os mesmos valores, entre 0,9 e 1,0 e em relação ao valor de SNR, todos os valores mantiveram-se constantes, entre 3 e 4. Provavelmente, algumas destas mutações deveriam ter sido retiradas do *plex* pelo operador aquando a optimização, dado que este analisou unicamente o valor de extensão de cada mutação, ignorando o valor do SNR e o genótipo atribuído a cada mutação.

Plex 8

Após a remoção de 5 conjuntos de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 8 passou a ser constituído por 26 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.53A e 6.53B) constatou-se que ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuíram as interações entre eles, o que se traduziu numa diminuição dos conjuntos de *primers* para 4, com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR e a necessitar de optimização.

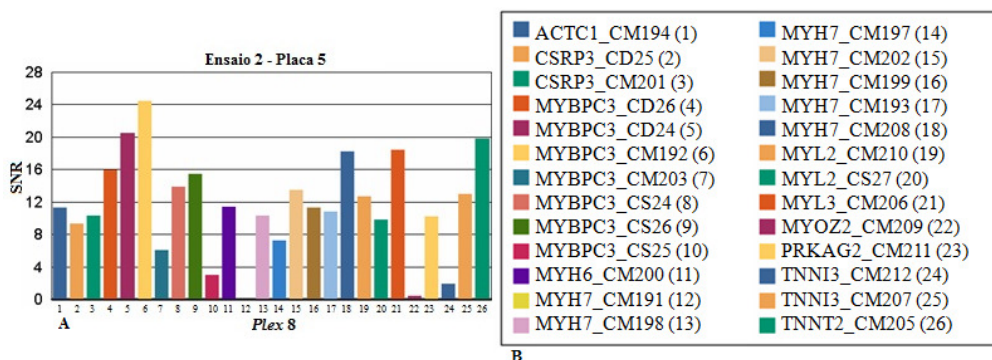


Figura 6.53 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 8 da Placa 5 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 26 mutações analisadas neste *plex* 8. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 26 mutações do *plex* 8 do Ensaio 2 (Anexo 15), constatou-se que ainda existem 4 mutações, em que a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Apesar dos valores de extensão manterem-se aceitáveis, entre 2 e 4, ao analisar as mutações CM191 (posição nº 12 na Figura 6.53) no gene *MYH7*; CM212 (posição nº 24 na Figura 6.53) no gene *TNNI3* sem genótipo identificado (sem alelos – N); CS25 (posição nº 10

na Figura 6.53) no gene *MYBPC3* e CM209 (posição nº 22 na Figura 6.53) no gene *MYOZ2* com um genótipo conservativo (A), face aos valores de SNR, constatou-se que estes mantiveram-se constantes, entre 0 e 1. Provavelmente, algumas destas mutações deveriam ter sido retiradas do *plex* pelo operador aquando a optimização, dado que este analisou unicamente o valor de extensão de cada mutação, ignorando o valor do SNR e o genótipo atribuído a cada mutação.

Plex 9

Após a remoção de 2 conjuntos de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 9 passou a ser constituído por 30 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.54A e 6.54B) constatou-se que mesmo ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuindo as interacções entre eles, neste caso, o número de conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR aumentou, dado só existirem 4 conjuntos de *primers* com um valor de SNR, extensão e de significancia estatística aceitável.

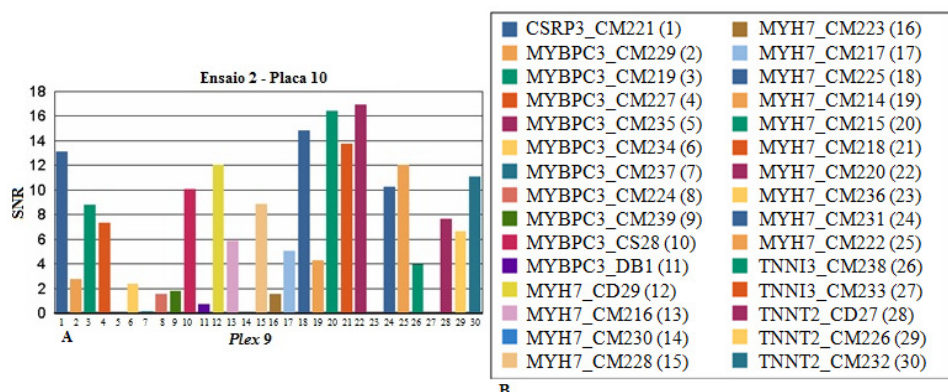


Figura 6.54 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 9 da Placa 10 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 30 mutações analisadas neste *plex* 9. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 28 mutações do *plex* 9 do Ensaio 2 (Anexo 17), constatou-se que em 26 mutações neste *plex*, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Apesar de ter ocorrido a remoção de 2 mutações por parte do operador, com o objectivo de optimizar o *plex*, em todos os 3 parametros analisados, valor de SNR, extensão e genótipo atribuído a cada uma das mutações, constatou-se não ocorreu nenhuma melhoria face ao Ensaio 1, necessitando de optimizar este *plex* no seu todo.

Plex 10

Após a remoção de 2 conjuntos de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 10 passou a ser constituído por 27 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.55A e 6.55B) constatou-se que ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuíram as interações entre eles, o que se traduziu numa diminuição dos conjuntos de *primers* para 4, com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR e a necessitar de optimização.

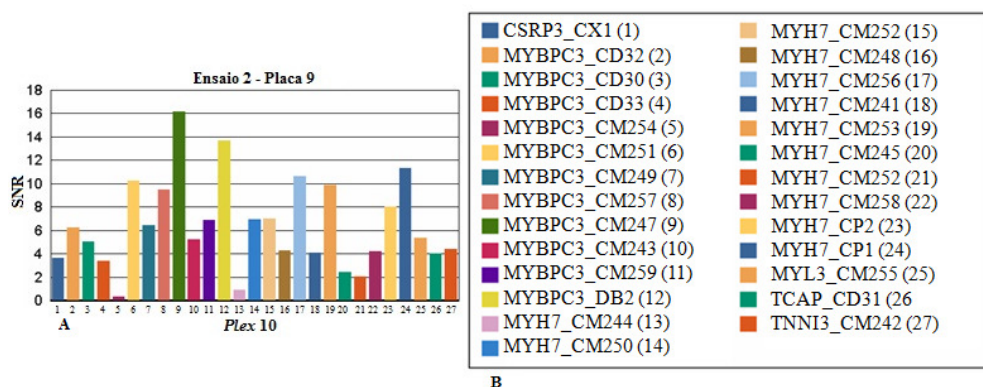


Figura 6.55 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 10 da Placa 10 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 27 mutações analisadas neste *plex* 10. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 27 mutações do *plex* 10 do Ensaio 2 (Anexo 19), constatou-se que ainda existem 4 mutações, em que a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Apesar dos valores de extensão serem aceitáveis, de valor 3 das mutações CM257 (posição nº 8 na Figura 6.55) no gene *MYBPC3*; CM245 (posição nº 20 na Figura 6.55) no gene *MYH7* e CM254 (posição nº 5 na Figura 6.55) no gene *MYBPC3*, os valores de SNR continuam constantes, entre 0 e 2, em que não se conseguiu identificar qualquer genótipo (sem alelos – N). Provavelmente, algumas destas mutações deveriam ter sido retiradas do *plex* pelo operador aquando a optimização, dado que este analisou unicamente o valor de extensão de cada mutação, ignorando o valor do SNR e o genótipo atribuído a cada mutação.

Plex 11

Após a remoção de um conjunto de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 11 passou a ser constituído por 27 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.56A e 6.56B)

constatou-se que mesmo ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuindo as interações entre eles, neste caso, o número de conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR aumentou, dado só existirem 7 conjuntos de *primers* com um valor de SNR, extensão e de significancia estatística aceitável.

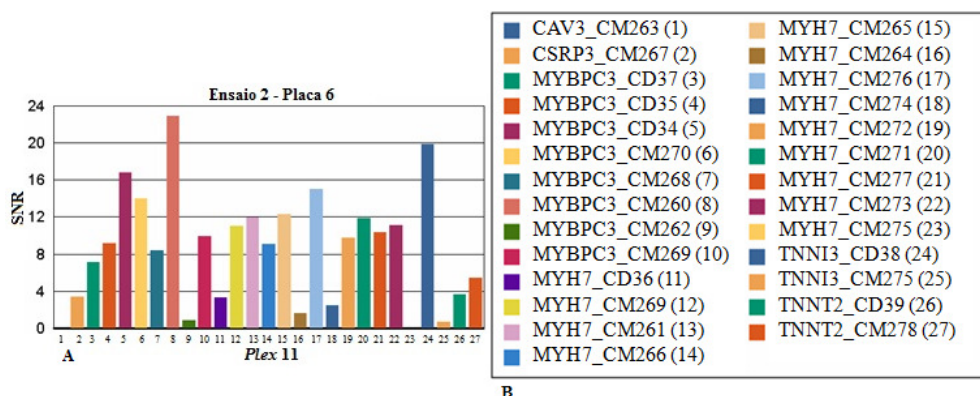


Figura 6.56 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 11 da Placa 6 do Ensaio 2. No eixo das abscissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 27 mutações analisadas neste *plex* 11. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 27 mutações do *plex* 11 do Ensaio 2 (Anexo 21), constatou-se que em 20 mutações neste *plex*, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Apesar de ter ocorrido a remoção de uma mutação por parte do operador, com o objectivo de otimizar o *plex*, em todos os 3 parametros analisados, valor de SNR, extensão e genótipo atribuído a cada uma das mutações, constatou-se não ocorreu nenhuma melhoria face ao Ensaio 1, necessitando de otimizar este *plex* no seu todo.

Plex 12

Após a remoção de 3 conjuntos de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 12 passou a ser constituído por 22 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.57A e 6.57B) constatou-se que mesmo ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuindo as interações entre eles, neste caso, o número de conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR aumentou, dado só existirem 10 conjuntos de *primers* com um valor de SNR, extensão e de significancia estatística aceitável.

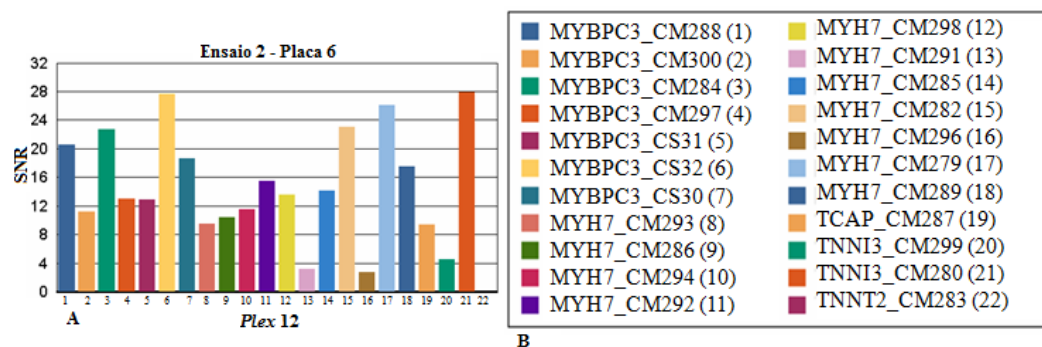


Figura 6.57 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 12 da Placa 6 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 22 mutações analisadas neste *plex* 12. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 22 mutações do *plex* 12 do Ensaio 2 (Anexo 23), constatou-se que em 12 mutações neste *plex*, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Apesar de ter ocorrido a remoção de 3 mutações por parte do operador, com o objectivo de otimizar o *plex*, em todos os 3 parametros analisados, valor de SNR, extensão e genótipo atribuído a cada uma das mutações, constatou-se não ocorreu nenhuma melhoria face ao Ensaio 1, necessitando de otimizar este *plex* no seu todo.

Plex 13

Após a remoção de um conjunto de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 13 passou a ser constituído por 24 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.58A e 6.58B) constatou-se que mesmo ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuindo as interacções entre eles, neste caso, o número de conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR aumentou, dado só existirem 8 conjuntos de *primers* com um valor de SNR, extensão e de significancia estatistica aceitável.

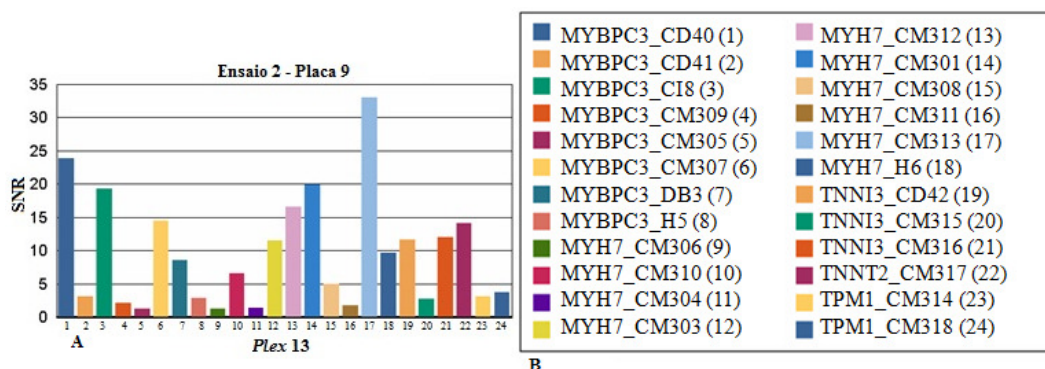


Figura 6.58 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 13 da Placa 9 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 24 mutações analisadas neste *plex* 13. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 24 mutações do *plex* 13 do Ensaio 2 (Anexo 25), constatou-se que em 16 mutações neste *plex*, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Apesar de ter ocorrido a remoção de uma mutação por parte do operador, com o objectivo de otimizar o *plex*, em todos os 3 parametros analisados, valor de SNR, extensão e genótipo atribuído a cada uma das mutações, constatou-se não ocorreu nenhuma melhoria face ao Ensaio 1, necessitando de otimizar este *plex* no seu todo.

Plex 14

Após a remoção de um conjunto de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 14 passou a ser constituído por 21 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.59A e 6.59B) constatou-se que mesmo ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuindo as interacções entre eles, neste caso, o número de conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR aumentou, dado só existirem 8 conjuntos de *primers* com um valor de SNR, extensão e de significancia estatistica aceitável.

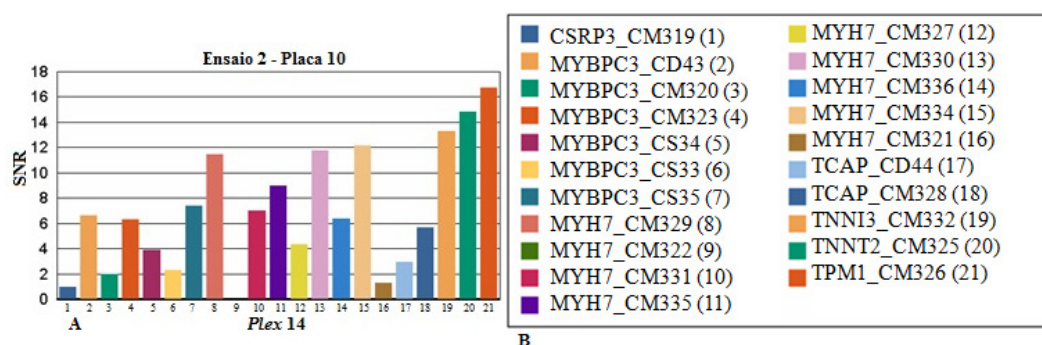


Figura 6.59 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 14 da Placa 10 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 24 mutações analisadas neste *plex* 14. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 21 mutações do *plex* 14 do Ensaio 2 (Anexo 27), constatou-se que em 13 mutações neste *plex*, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Apesar de ter ocorrido a remoção de uma mutação por parte do operador, com o objectivo de

optimizar o *plex*, em todos os 3 parametros analisados, valor de SNR, extensão e genótipo atribuído a cada uma das mutações, constatou-se não ocorreu nenhuma melhoria face ao Ensaio 1, necessitando de optimizar este *plex* no seu todo.

Plex 15

Após a remoção de um conjunto de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex 15* passou a ser constituído por 18 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.60A e 6.60B) constatou-se que mesmo ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuindo as interacções entre eles, neste caso, o número de conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR aumentou, dado só existirem 3 conjuntos de *primers* com um valor de SNR, extensão e de significancia estatistica aceitável.

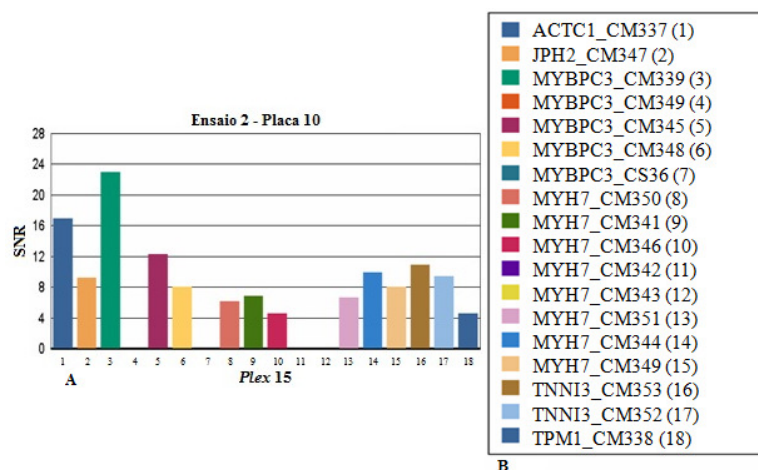


Figura 6.60 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex 15* da Placa 10 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 19 mutações analisadas neste *plex 15*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 18 mutações do *plex 15* do Ensaio 2 (Anexo 29), constatou-se que em 15 mutações neste *plex*, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Apesar de ter ocorrido a remoção de uma mutação por parte do operador, com o objectivo de optimizar o *plex*, em todos os 3 parametros analisados, valor de SNR, extensão e genótipo atribuído a cada uma das mutações, constatou-se não ocorreu nenhuma melhoria face ao Ensaio 1, necessitando de optimizar este *plex* no seu todo.

Plex 16

Após a remoção de 2 conjuntos de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 16 passou a ser constituído por 13 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.61A e 6.61B) constatou-se que mesmo ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuindo as interacções entre eles, neste caso, o número de conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR aumentou, dado só existirem 2 conjuntos de *primers* com um valor de SNR, extensão e de significancia estatística aceitável.

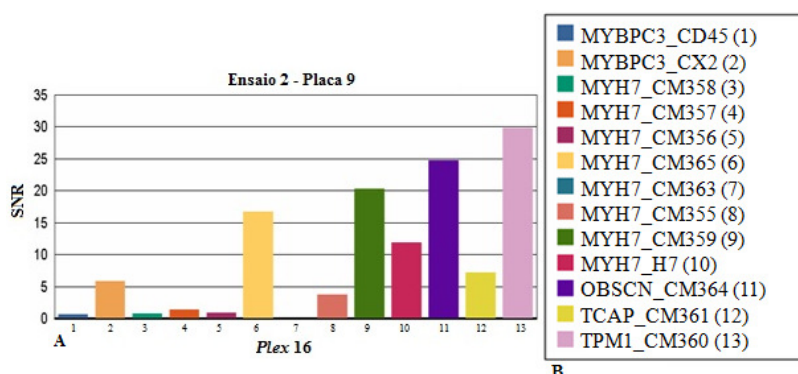


Figura 6.61 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 16 da Placa 9 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 13 mutações analisadas neste *plex* 16. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 13 mutações do *plex* 16 do Ensaio 2 (Anexo 31), constatou-se que em 11 mutações neste *plex*, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Apesar de ter ocorrido a remoção de uma mutação por parte do operador, com o objectivo de otimizar o *plex*, em todos os 3 parametros analisados, valor de SNR, extensão e genótipo atribuído a cada uma das mutações, constatou-se não ocorreu nenhuma melhoria face ao Ensaio 1, necessitando de otimizar este *plex* no seu todo.

Plex 17

Após a remoção de um conjunto de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 17 passou a ser constituído por 13 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.62A e 6.62B) constatou-se que ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuíram as interacções entre eles, o que se traduziu numa diminuição dos conjuntos de *primers* para um, com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR e a necessitar de optimização.

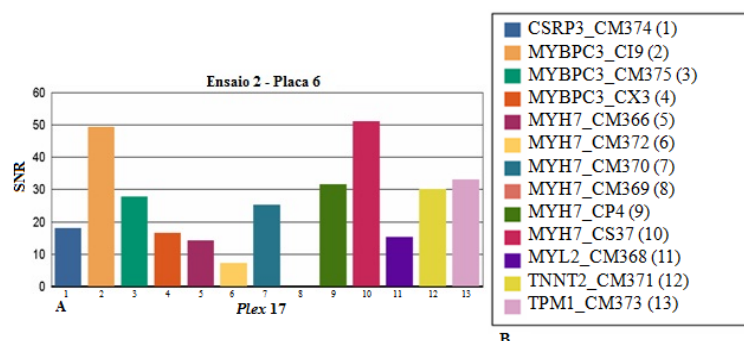


Figura 6.62 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 17 da Placa 6 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 13 mutações analisadas neste plex 17. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 27 mutações do plex 17 do Ensaio 2 (Anexo 33), constatou-se que ainda existe uma mutação, em que a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Ao avaliar o valor de SNR desta mutação CM369 (posição nº 8 na Figura 6.62) no gene *MYH7*, constatou-se que este passou de 1 para 20, com um valor de extensão bastante aceitável, de 20, contudo o eu genótipo não foi identificado (sem alelo – N). Além da mutação retirada anteriormente pelo operador e de modo a que este plex seja completamente otimizado, esta mutação deveria ter sido retirada do plex pelo operador aquando a optimização, dado que este analisou unicamente o valor de extensão de cada mutação, ignorando o valor do SNR e o genótipo atribuído a cada mutação.

Plex 18

Após a remoção de 2 conjuntos de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o plex 18 passou a ser constituído por 9 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.63A e 6.63B) constatou-se que ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por plex, diminuíram as interações entre eles, o que se traduziu numa diminuição dos conjuntos de *primers* para 2, com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR e a necessitar de optimização.

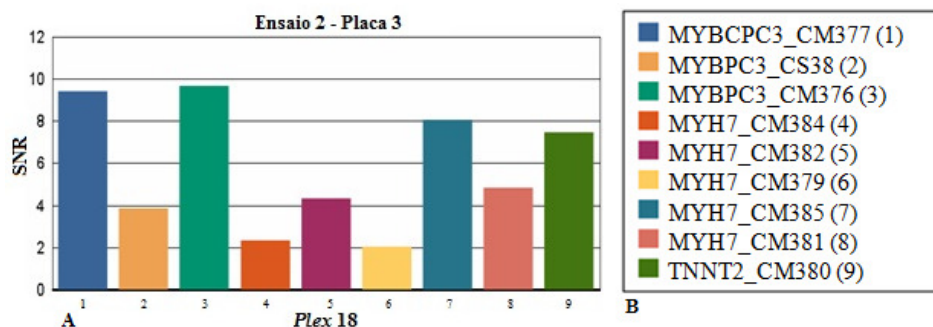


Figura 6.63 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 18 da Placa 3 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 11 mutações analisadas neste *plex* 18. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 9 mutações do *plex* 18 do Ensaio 2 (Anexo 35), constatou-se que ainda existem 2 mutações, em que a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Ao avaliar o valor de SNR das mutações CM384 (posição nº 4 na Figura 6.63) e CM379 (posição nº 6 na Figura 6.63) no gene *MYH7*, constatou-se que este para as duas mutações passou de 5 e 0 para 15 e 20, respectivamente, ambas com um valor de extensão aceitável, de 8 e 20, respectivamente. Estas duas mutações só necessitam de optimização, dado que não se conseguiu identificar o seu genótipo (sem alelos – N). Além da remoção de 2 conjuntos de *primers* anteriormente retirados pelo operador, com o objectivo do *plex* ficar optimizado, estas duas mutações deveriam também ter sido retiradas do *plex* pelo operador aquando a optimização, dado que este analisou unicamente o valor de extensão de cada mutação, ignorando o valor do SNR e o genótipo atribuído a cada mutação.

Plex 19

Após a remoção de 2 conjuntos de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 19 passou a ser constituído por 4 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.64A e 6.64B) constatou-se que ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuíram as interacções entre eles, o que se traduziu numa diminuição dos conjuntos de *primers* para 2, com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR e a necessitar de optimização.

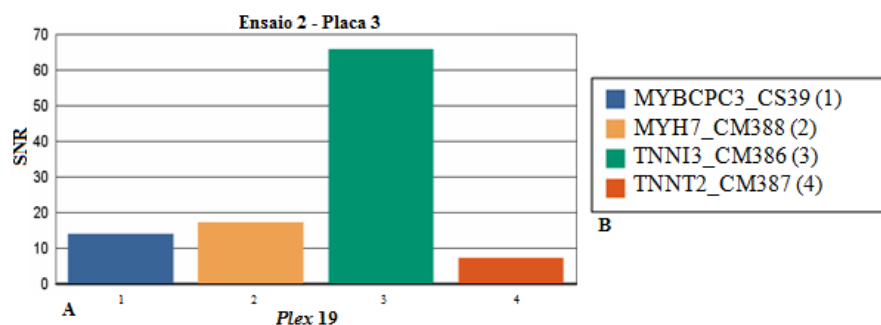


Figura 6.64 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 19 da Placa 3 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 4 mutações analisadas neste *plex* 19. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 4 mutações do *plex* 19 do Ensaio 2 (Anexo 37), constatou-se que ainda existem 2 mutações, em que a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Ao avaliar o valor de SNR das mutações CM388 (posição nº 2 na Figura 6.64) no gene *MYH7* e CM387 (posição nº 4 na Figura 6.64) no gene *TNNT2*, constatou-se que este para as duas mutações passou de 4 e 1 para 10 e 10, respectivamente, ambas com um valor de extensão aceitável, de 20 e 30, respectivamente. Estas duas mutações só necessitam de optimização, dado que para a primeira não se conseguiu identificar o genótipo (sem alelos – N) e a segunda apresenta um genótipo de baixa probabilidade (D). Além da remoção de 2 conjuntos de *primers* anteriormente retirados pelo operador, com o objectivo do *plex* ficar optimizado, estas duas mutações deveriam também ter sido retiradas do *plex* pelo operador aquando a optimização, dado que este analisou unicamente o valor de extensão de cada mutação, ignorando o valor do SNR e o genótipo atribuído a cada mutação.

Plex 20

Após a remoção de um conjunto de *primers* do Ensaio 1 por parte do operador, o *plex* 20 passou a ser constituído por 4 conjuntos de *primers* e ao analisar os conjuntos de *primers* quanto ao seu valor de SNR nas placas do Ensaio 2 (Figura 6.65A e 6.65B) constatou-se que ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, diminuíram as interacções entre eles, o que se traduziu numa diminuição dos conjuntos de *primers* para um, com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR e a necessitar de optimização.

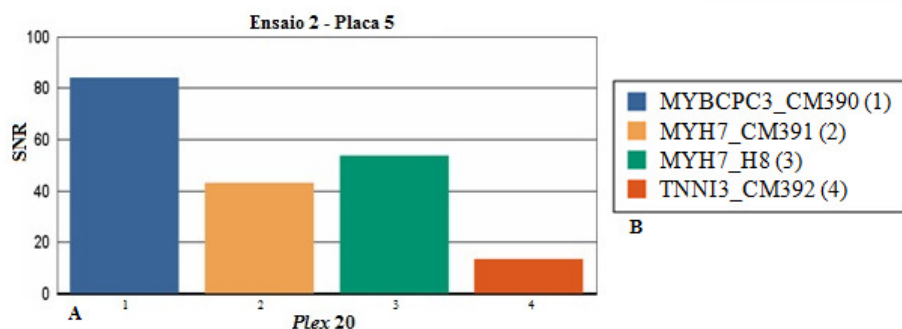


Figura 6.65 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o Plex 20 da Placa 5 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 4 mutações analisadas neste Plex 20. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 4 mutações do *plex 20* do Ensaio 2 (Anexo 39), constatou-se que ainda existe uma mutação, em que a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Ao avaliar o valor de SNR da mutação CM391 (posição nº 2 na Figura 6.65) no gene *MYH7*, constatou-se que este melhorou substancialmente, passando de 0 para 40, sendo o valor de extensão aceitável de 15. Esta mutação só necessita de optimização quando ao seu genótipo, que é de baixa probabilidade (D). Por isto, provavelmente, esta mutação deveria ter sido retirada do *plex* pelo operador aquando a optimização, dado que este analisou unicamente o valor de extensão de cada mutação, ignorando o valor do SNR e o genótipo atribuído a cada mutação.

Plex 21

O *plex 21* é constituído exclusivamente por um conjunto de *primers* e ao analisar o seu valor de SNR das placas do Ensaio 2, constatou-se que este apresenta um valor de SNR de 6, com um genótipo atribuído de conservativo (A) e um valor de extensão excelente, de 60. Constatou-se que apenas na placa 3, esta mutação apresentou uma extensão insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística, muito provavelmente devido a algum erro de operador que tenha ocorrido, influenciando a concentração ao nível dos *primers*.

Os *plexes* 22 a 31 do Ensaio 2 resultam da realocação de alguns conjuntos de *primers*, que foram retirados dos *plexes* 1 a 20 do Ensaio 1, pelo operador aquando a optimização.

Plex 22

O *plex 22* é constituído por 5 conjuntos de *primers* alocados do *plex 1* aquando a optimização pelo operador e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 2 (Figura 6.66A e 6.66B), verificou-se que existe apenas 2 conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo do *plex*.

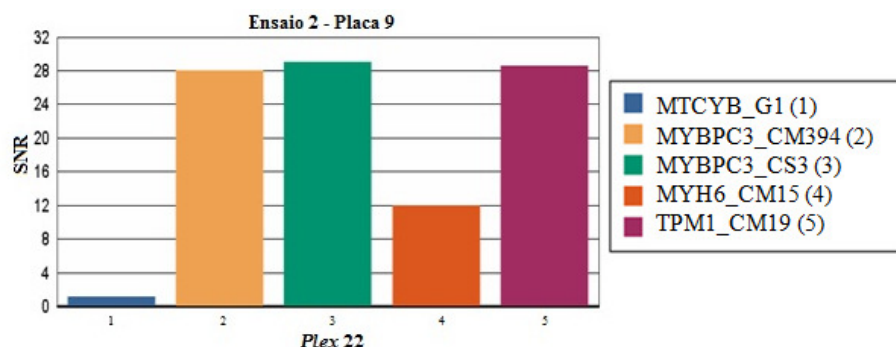


Figura 6.66 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex 22* da Placa 9 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas a mutação analisada neste *plex 22*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 5 mutações nas placas do Ensaio 2 (Anexo 43), constatou-se que em 2 das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Após ter sido realocada do *plex 1*, a mutação G1 (posição nº 1 na Figura 6.66) no gene *MTCYB* continua a apresentar um genótipo de baixa probabilidade (D), um valor de extensão baixo, de 1,3 e um valor de SNR praticamente nulo, necessitando de uma nova optimização num futuro ensaio. A outra mutação CM15 (posição nº 4 na Figura 6.66) no gene *MYH6*, também realocada do *plex 1*, passou a apresentar um genótipo conservativo (A), dado que no Ensaio 1, o genótipo não era identificado (sem alelos – N) e um valor de SNR elevado, cerca de 10, contudo o valor de extensão continua baixo, cerca de 1,0. Esta mutação necessita de optimização quanto ao valor de extensão, provavelmente num ensaio futuro.

Plex 23

O *plex 23* é constituído por 4 conjuntos de *primers* alocados do *plex 2* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placa do Ensaio 2 (Figura 6.67A e 6.67B), verificou-se que todos o conjuntos de *primers* apresentam um valor de SNR elevado. Estas mutações foram alocadas para este *plex* provenientes do *plex 2*, porque não se encontravam optimizadas e ao serem testadas num menor número de *primers* neste *plex*, passaram a

apresentar um genótipo moderado (B) e um valor de extensão aceitável de 4,0, bem como também o valor de SNR.

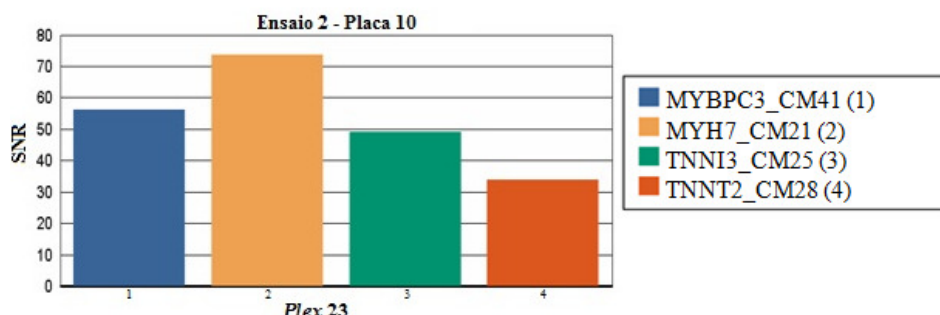


Figura 6.67 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 23 da Placa 10 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 4 mutações analisadas neste *plex* 23. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 4 mutações nas placas do Ensaio 2 (Anexo 45), constatou-se que somente na placa 3, numa das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. A mutação CM21 (posição nº 2 na Figura 6.67) no gene *MYH7* apresenta um genótipo de baixa probabilidade (D), sendo a única mutação a necessitar de otimização num ensaio futuro.

Plex 24

O *plex* 24 é constituído por 5 conjuntos de *primers* alocados do *plex* 3 e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 2 (Figura 6.68A e 6.68B), verificou-se que apenas um conjunto de *primers* apresenta um valor de extensão inferior a 45% do valor máximo do SNR, mesmo tendo sido realocado num novo *plex*. Estas mutações foram alocadas para este *plex* provenientes do *plex* 3, porque não se encontravam optimizadas e ao serem testadas num menor número de *primers* neste *plex*, passaram a apresentar um genótipo moderado (B) e um valor de extensão aceitável de 4,0, bem como também o valor de SNR.

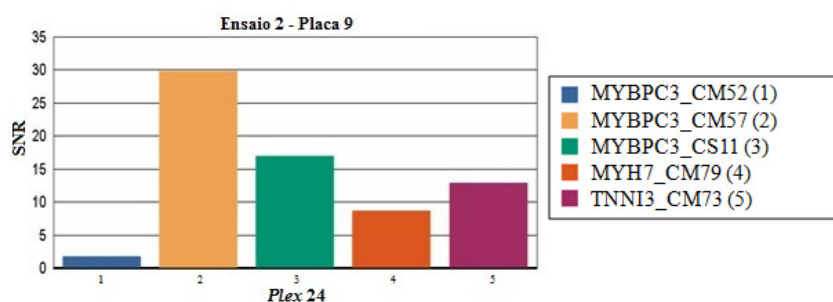


Figura 6.68 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 24 da Placa do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 5 mutações analisadas neste *plex* 24. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 5 mutações nas placas do Ensaio 2 (Anexo 47), constatou-se que apenas numa das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Esta mutação CM52 (posição nº 1 na Figura 6.68) no gene *MYBPC3* ao ser transferida do *plex* 3, passou a apresentar um genótipo moderado (B), um valor de extensão elevado, cerca de 10, contudo apresenta um valor de SNR baixo, cerca de 4, necessitando de uma futura optimização em relação a este valor.

Plex 25

O *plex* 25 é constituído por 4 conjuntos de *primers* alocados do *plex* 4 e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 2 (Figura 6.69A e 6.69B), constatou-se que existe apenas 2 conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, mesmo tendo sido realocado num novo *plex*. Estas mutações foram alocadas para este *plex* provenientes do *plex*4, porque não se encontravam optimizadas e mesmo ao serem testadas num menor número de *primers* neste *plex*, continuam a necessitar de optimização.

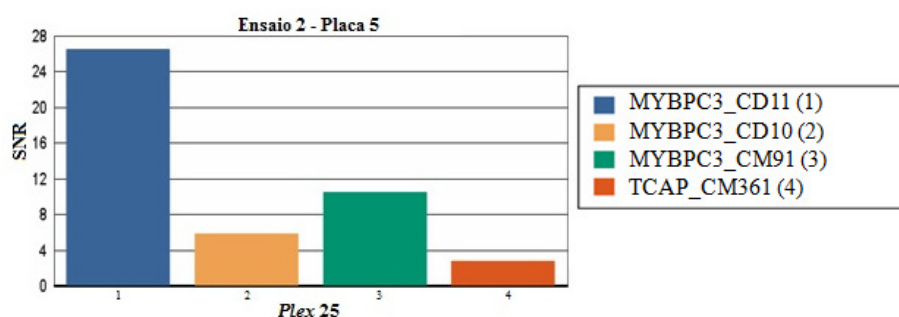


Figura 6.69 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 25 da Placa 5 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 4 mutações analisadas neste *plex* 25. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 3 mutações nas placas do Ensaio 2 (Anexo 49), constatou-se que em 3 das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. A mutação CD10 (posição nº 2 na Figura 6.69) no gene *MYBPC3* apesar de apresentar um valor

de SNR elevado de 12, o seu valor de extensão é baixo, de 1,4 e o genótipo não consegue ser identificado (sem alelos – N). Apesar da mutação CM361 (posição nº 4 na Figura 6.69) no gene *TCAP* possuir um valor de extensão aceitável, de 4, não possui um genótipo identificado (sem alelos – N) nem um valor de SNR aceitável, tendo um valor de 4. Por outro lado, a mutação CM91 (posição nº 3 na Figura 6.69) no gene *MYBPC3* possui um genótipo de baixa probabilidade (D), apesar de apresentar um valor de SNR elevado e um valor de extensão aceitável, de 2. Estas 3 mutações continuam a necessitar de optimização.

Plex 26

O *plex 26* é constituído por 7 conjuntos de *primers* na placa 3 e por 9 conjuntos de *primers* nas placas 5, 6, 9 e 10 alocados dos *plexes* 6, 8 e 9. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* da placa 3 do Ensaio 2 (Figura 6.70A e 6.70B), verificou-se que existem 4 conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, mesmo realocados neste *plex*. As mutações H4 (posição nº 4 na Figura 6.70) no gene *MYH7* e CM213 (posição nº 7 na Figura 6.70) no gene *TNNT2* apesar de possuírem um genótipo conservativo (A), possuem um valor de SNR reduzido, de 1 e um valor de extensão baixo, de 2,0. As outras duas mutações CM414 (posição nº 5 na Figura 6.70) no gene *MYL3* e CM417 (posição nº 6 na Figura 6.70) no gene *PRKAG2* apesar de apresentarem um genótipo moderado (B), possuem um valor de SNR baixo, de 0 e 3, respectivamente e um valor de extensão reduzido.

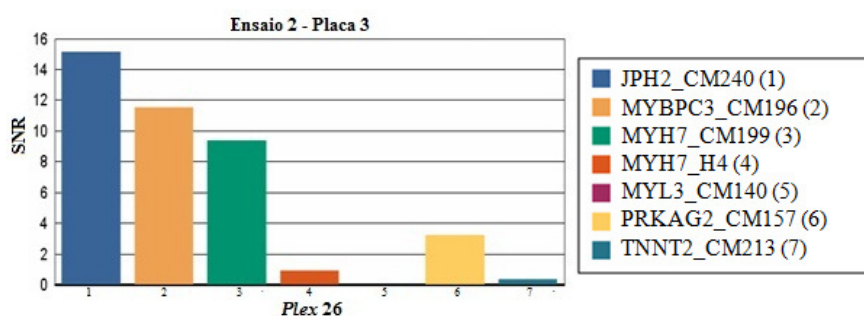


Figura 6.70 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex 26* da Placa 2 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 7 mutações analisadas neste *plex 26*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Em relação às placas 5, 6, 9 e 10, cada uma com 9 conjuntos de *primers* alocados dos *plexes* 6, 8, 9, 12 e 14 ao verificar os valores de SNR das placas do Ensaio 2 (Figura 6.70A e 6.70B), constatou-se que existem 2 conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, mesmo realocados neste *plex* com um genótipo de

baixa probabilidade (D) e um valor de extensão também baixa, cerca de 1,2, correspondendo às CM425 (posição nº 2 na Figura 6.70) no gene *MYBPC3* não apresenta genótipo (sem alelos – N), enquanto a CM418 (posição nº 5 na Figura 6.70) no gene *MYH7* apresenta um genótipo de baixa probabilidade (D).

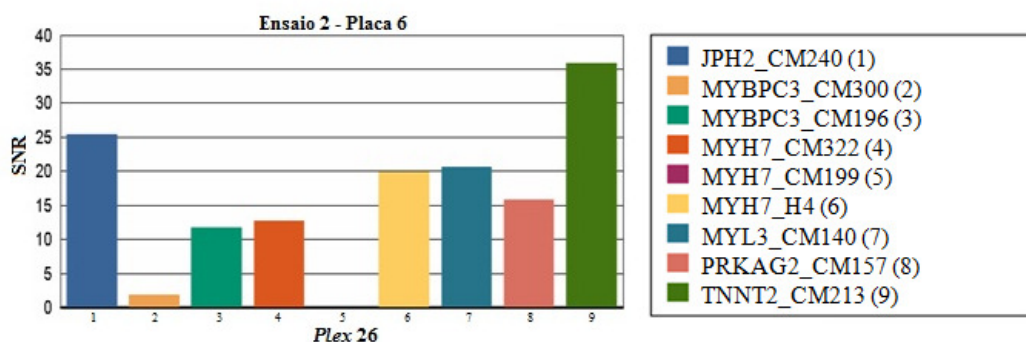


Figura 6.70 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 26 da Placa 6 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 9 mutações analisadas neste *plex* 26. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 9 mutações nas placas do Ensaio 2 (Anexo 51), constatou-se que além destas 2 mutações, ainda existe mais uma mutação CM322 (posição nº 4 na Figura 6.70) no gene *MYH7* que não apresenta genótipo identificado (sem alelos – N) e que tanto o valor de SNR como de extensão são nulos. Apesar de algumas destas mutações apresentarem um SNR elevado, é necessário ter em conta o seu valor de extensão, bem como o genótipo atribuído a cada uma das mutações, necessitando de optimização a este nível.

Plex 27

O *plex* 27 é constituído apenas por 2 conjuntos de *primers*, provenientes do *plex* 26 e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 2 (Figura 6.71A e 6.71B), constatou-se que apenas um conjunto de *primers* apresenta valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR, mesmo realocado num novo *plex*.

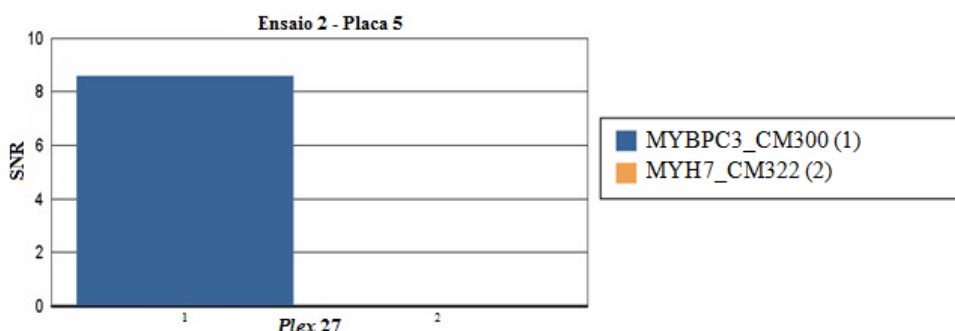


Figura 6.71 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 27 da Placa 5 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 2 mutações analisadas neste *plex* 27. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 2 mutações nas placas do Ensaio 2 (Anexo 53), constatou-se que apenas numa das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. A mutação CM322 (posição nº 2 na Figura 6.71) no gene *MYH7* apesar de apresentar um valor de SNR nulo em quase todas as placas, apresenta um valor de extensão bastante aceitável, de 30 e um genótipo atribuído de conservativo (A). Esta mutação só necessitará de uma futura optimização em relação ao seu valor de SNR, dado que os outros dois parâmetros estão optimizados.

Plex 28

O *plex* 28 é constituído por 6 conjuntos de *primers* alocados de outro *plexes* 6, 7, 14 e 19 e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 2 (Figura 6.72A e 6.72B), verificou-se que apenas um conjunto de *primers* apresenta um valor de SNR reduzido numa única placa.

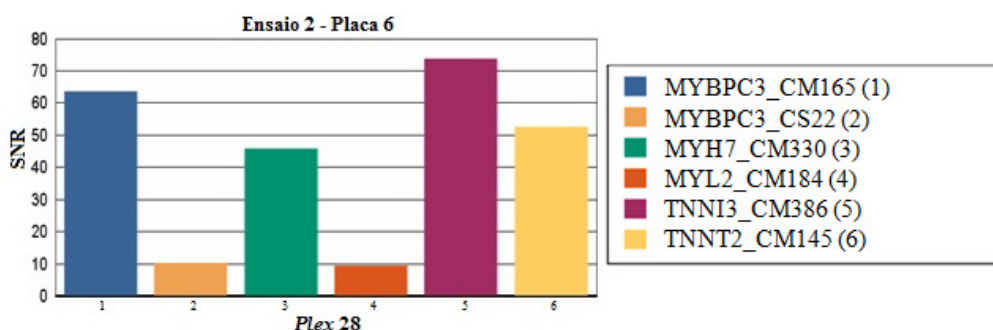


Figura 6.72 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 28 da Placa 6 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 6 mutações analisadas neste *plex* 28. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 6 mutações nas placas do Ensaio 2 (Anexo 55), constatou-se que apenas um das mutações numa única placa, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. A mutação CM184 (posição nº 4 na Figura 6.72) no gene *MYL2* apesar de possuir um genótipo conservativo (A), apresenta um valor de extensão de 1,5 e um valor de SNR nulo numa única placa. Tendo em conta que estas mutações não funcionaram no Ensaio

1 e aquando a optimização por parte do operador, ao serem alocadas para este *plex*, tiveram uma melhoria substancial em relação os três parâmetros analisados, somente uma das mutações necessita de optimização futura.

Plex 29

O *plex 29* é constituído apenas por um conjunto de *primers* alocado do *plex 19* e ao analisar o valor de SNR do seu conjunto de *primers* das placas no Ensaio 2 (Anexo 57), constatou-se que este conjunto de *primers* para a mutação CM389 no gene *SLC25A4*, apesar de possuir um valor de extensão aceitável, de 4, apresenta um valor de SNR de 2,4 e um genótipo de baixa probabilidade (D). Será necessário uma optimização futura em relação a esta mutação.

Plex 30

O *plex 30* é constituído por 2 conjuntos de *primers* alocados dos *plexes 12* e *16* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 2 (Figura 6.73A e 6.73B), constatou-se que ambos apresentam um valor de SNR elevado. Tendo em conta que estas mutações não funcionando no Ensaio 1, ao serem realocadas num novo *plex* para o Ensaio 2, passaram a apresentar um valor de SNR elevado.

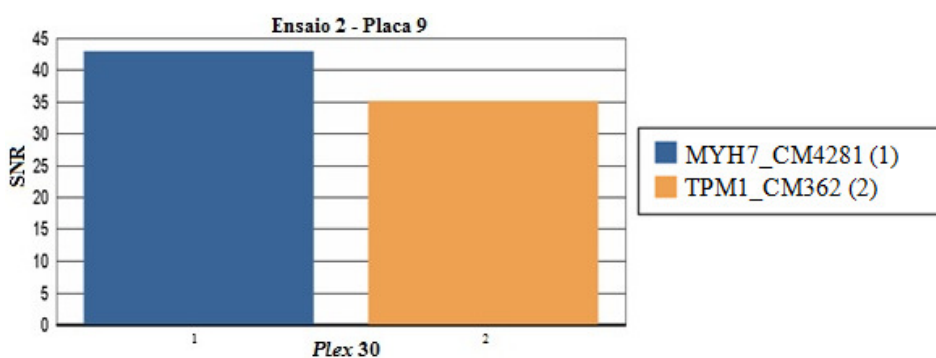


Figura 6.73 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex 30* da Placa 9 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 2 mutações analisadas neste *plex 30*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 2 mutações nas placas do Ensaio 2 (Anexo 59), constatou-se que as duas mutações CM436 (posição nº 2 na Figura 6.73) no gene *TPM1* e CM345 (posição nº 1 na Figura 6.73) no gene *MYH7* além de apresentarem um valor de SNR elevado, possuem um genótipo conservativo (A) e moderado (B), com um valor de extensão elevado.

Plex 31

O *plex 31* é constituído por 2 conjuntos de *primers* alocados dos *plexes* 19 e 20 e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 2 (Figura 6.74A e 6.74B), verificou-se que uma das mutações apresenta um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, mesmo tendo sido realocada de outro *plex*.

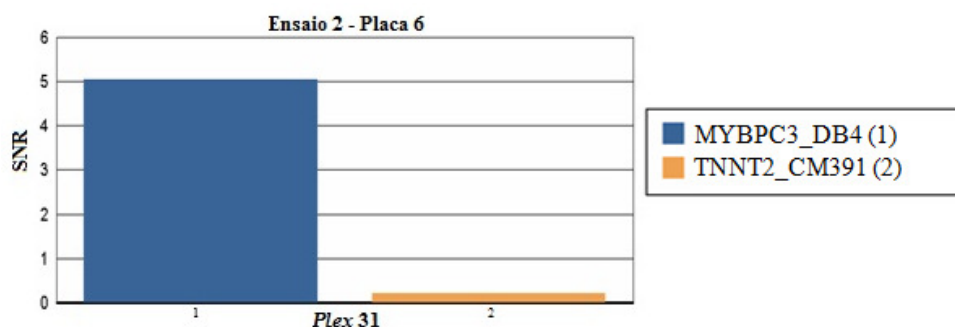


Figura 6.74 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex 31* da Placa 6 do Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 2 mutações analisadas neste *plex 31*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 2 mutações nas placas do Ensaio 2 (Anexo 61), constatou-se que uma das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Apesar desta alteração de posição nos *plexes*, a mutação CM437 (posição nº 2 na Figura 6.74) no gene *TNNT2* continua a apresentar um genótipo de baixa probabilidade (D) e um valor de SNR reduzido e um valor de extensão também reduzido, cerca de 0,7.

Ao analisar os 31 *plexes* que constituem o Ensaio 2, constatou-se que após a remoção das 72 mutações, efectuada pelo operador aquando da optimização do Ensaio 1, ocorreu uma reorganização no número de conjuntos de *primers* por *plexes*, em que alguns dos conjuntos de *primers* removidos no Ensaio 1, formaram os *plexes* 22 a 31. No entanto, nem todas as mutações foram reintroduzidas nos novos *plexes* pelo operador no ensaio 2. As mutações que não foram reintroduzidas nos *plexes* 22 a 31 no Ensaio 2 estão descritas na Tabela 6.5, tendo sido removidas deste Ensaio.

Tabela 6.5 – Lista de mutações que foram retiradas dos 21 *plexes* do Ensaio 1, mas que não foram reintroduzidas nos *plexes* 22 a 31 no Ensaio 2

Mutação	Plex de origem
<i>TNNI3_CM6</i>	<i>plex 1</i>
<i>MYBPC3_CM18</i>	<i>plex 1</i>
<i>MYBPC3_CM3</i>	<i>plex 1</i>
<i>MYBPC3_CM394</i>	<i>plex 1</i>
<i>MYBPC3_CD6</i>	<i>plex 1</i>
<i>TPM1_CM20</i>	<i>plex 1</i>
<i>MYBPC3_CS4</i>	<i>plex 1</i>
<i>MYH7_CM7</i>	<i>plex 1</i>
<i>MYH7_CM42</i>	<i>plex 2</i>
<i>MYBPC3_CI3</i>	<i>plex 2</i>
<i>MYBPC3_CM47</i>	<i>plex 2</i>
<i>MYBPC3_CS6</i>	<i>plex 2</i>
<i>MYL2_CM65</i>	<i>plex 3</i>
<i>MYBPC3_CM61</i>	<i>plex 3</i>
<i>MYO6_CM71</i>	<i>plex 3</i>
<i>MYBPC3_CS10</i>	<i>plex 3</i>
<i>MYBPC3_CM90</i>	<i>plex 4</i>
<i>MYH7_CM98</i>	<i>plex 4</i>
<i>MYBPC3_CS18</i>	<i>plex 5</i>
<i>MYBPC3_CM108</i>	<i>plex 5</i>
<i>MYBPC3_CM123</i>	<i>plex 5</i>
<i>TNNT2_CM124</i>	<i>plex 5</i>
<i>MYH7_CM161</i>	<i>plex 6</i>
<i>MYH7_CM163</i>	<i>plex 6</i>
<i>MYH7_CM161</i>	<i>plex 6</i>
<i>MYBPC3_CM170</i>	<i>plex 7</i>
<i>MYH7_CM175</i>	<i>plex 7</i>
<i>MYBPC3_CM204</i>	<i>plex 8</i>
<i>TNNT2_CM205</i>	<i>plex 8</i>
<i>MYBPC3_CD28</i>	<i>plex 9</i>
<i>MYBPC3_CI7</i>	<i>plex 11</i>
<i>MYL2_CM295</i>	<i>plex 12</i>
<i>TCAP_CM367</i>	<i>plex 17</i>

SLC25A4_CM389 *plex 19*

Ao avaliar cada um dos *plexes*, com base nos três parâmetros analisados, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada uma das mutações, verificou-se que ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, ocorreu uma melhoria significativa na maioria dos *plexes* nestes parâmetros. Os *plexes* 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 17, 18, 19, 20 obtiveram uma melhoria significativa em relação ao número de conjuntos de *primers* por otimizar, necessitando unicamente de uns ajustes sobre quais as mutações que deveriam ser retiradas futuramente. Nos restantes *plexes* 3, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15 e 16, apesar de também ter ocorrido a remoção de um número de conjuntos de *primers*, constatou-se que não ocorreu nenhuma melhoria significativa quanto ao valor de SNR, valor de extensão e ao genótipo atribuído a cada uma das mutações que os constituem, necessitando de uma optimização do *plex* no seu todo. Em relação às mutações alocadas nos *plexes* 22 a 31, ocorreu uma melhoria significativa na optimização da maioria das mutações, visto que estas foram organizadas num *plex* com um menor número de conjuntos de *primers* e assim o seu valor de SNR, valor de extensão e o genótipo atribuído melhorou substancialmente.

6.2.5 Ensaio 3

De forma a se poder correctamente otimizar e validar esta técnica para o diagnóstico genético da MH, é necessário que todas as 541 mutações estejam incluídas nos vários *plexes*. Como isto foi constatado não ter acontecido durante a análise do Ensaio 2 e como muitas das mutações não melhoraram pela realocação num *plex* distinto, decidiu-se neste Ensaio 3, voltar a colocar todas as mutações nos *plexes* de origem, mantendo igualmente as mutações descritas no Ensaio 2 nos *plexes* 21 a 31.

Por existir ainda um número considerável de conjuntos de *primers* a apresentarem valores inesperados, quanto ao seu valor de SNR, de extensão e mesmo ao genótipo atribuído a cada uma das mutações, foram igualmente realocados 37 conjuntos de *primers*, provenientes de vários *plexes*. Estes foram reagrupados em 4 novos *plexes* (*plexes* 32, 33, 34 e 35), perfazendo um total de 35 *plexes*, sendo testadas em 9 placas (Placas 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19), com o objectivo de otimizar o maior número de mutações.

Na Tabela 6.6 encontram-se listados os conjuntos de *primers* que foram alterados de posição dentro dos *plexes*, tendo ocorrido a reorganização da placa, de modo a tentar otimizar as reacções de extensão das 541 mutações. Estes conjuntos de *primers* permitem a

amplificação de regiões específicas dos genes *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNI3*, *TNNT2*, *PRKAG2*, *TPM1*, *MYL2*, *TCAP* e *MYO6*. Os restantes *primers* que amplificam as regiões específicas dos outros genes, mantiveram-se inalterados na sua localização dentro de cada *plex*.

Tabela 6.6 – Lista dos conjuntos de *primers* removidos após análise do Ensaio 2, constituído por 31 *plexes* para o Ensaio 2, constituído por 35 *plexes*.

Mutação	Ensaio 2	Ensaio 3
<i>TNNI3_CM6</i>	<i>plex 1</i>	<i>plex 32</i>
<i>MYH7_CM7</i>	<i>plex 1</i>	<i>plex 34</i>
<i>PRKAG2_C11</i>	<i>plex 1</i>	<i>plex 32</i>
<i>MYBPC3_CS4</i>	<i>plex 1</i>	<i>plex 33</i>
<i>TPM1_CM20</i>	<i>plex 1</i>	<i>plex 32</i>
<i>MYH7_CM42</i>	<i>plex 2</i>	<i>plex 33</i>
<i>MYL2_CM65</i>	<i>plex 3</i>	<i>plex 32</i>
<i>MYH7_CM68</i>	<i>plex 3</i>	<i>plex 32</i>
<i>MYH7_CM72</i>	<i>plex 3</i>	<i>plex 33</i>
<i>MYH7_CM89</i>	<i>plex 4</i>	<i>plex 33</i>
<i>MYBPC3_CM90</i>	<i>plex 4</i>	<i>plex 32</i>
<i>MYH7_CM98</i>	<i>plex 4</i>	<i>plex 35</i>
<i>MYBPC3_CM108</i>	<i>plex 5</i>	<i>plex 35</i>
<i>MYBPC3_CM123</i>	<i>plex 5</i>	<i>plex 33</i>
<i>TNNT2_CM124</i>	<i>plex 5</i>	<i>plex 32</i>
<i>MYBPC3_CS18</i>	<i>plex 5</i>	<i>plex 34</i>
<i>MYH7_CM141</i>	<i>plex 6</i>	<i>plex 32</i>
<i>MYH7_CM161</i>	<i>plex 6</i>	<i>plex 32</i>
<i>MYH7_CM163</i>	<i>plex 6</i>	<i>plex 33</i>
<i>MYBPC3_CM170</i>	<i>plex 7</i>	<i>plex 32</i>
<i>MYH7_CM175</i>	<i>plex 7</i>	<i>plex 32</i>
<i>MYBPC3_CM204</i>	<i>plex 8</i>	<i>plex 33</i>
<i>MYBPC3_CD28</i>	<i>plex 9</i>	<i>plex 34</i>
<i>MYBPC3_DB1</i>	<i>plex 9</i>	<i>plex 35</i>
<i>MYBPC3_DB2</i>	<i>plex 10</i>	<i>plex 33</i>
<i>MYL2_CM295</i>	<i>plex 12</i>	<i>plex 34</i>
<i>MYBPC3_DB3</i>	<i>plex 13</i>	<i>plex 36</i>
<i>TCAP_CM367</i>	<i>plex 17</i>	<i>plex 33</i>

<i>MYBPC3_CM393</i>	<i>plex 22</i>	<i>plex 34</i>
<i>MYBPC3_CM394</i>	<i>plex 22</i>	<i>plex 32</i>
<i>MYBPC3_CD47</i>	<i>plex 22</i>	<i>plex 32</i>
<i>MYBPC3_CM395</i>	<i>plex 22</i>	<i>plex 32</i>
<i>MYBPC3_CS41</i>	<i>plex 23</i>	<i>plex 32</i>
<i>MYBPC3_C111</i>	<i>plex 23</i>	<i>plex 34</i>
<i>MYBPC3_CM402</i>	<i>plex 23</i>	<i>plex 34</i>
<i>MYBPC3_CM405</i>	<i>plex 24</i>	<i>plex 34</i>
<i>MYO6_CM71</i>	<i>plex 24</i>	<i>plex 35</i>

A Figura 6.75 representa o novo desenho do *Spectrochip* para o Ensaio 3, já com a reorganização para os 35 *plexes*. Também nestas placas, os *plexes* foram distribuídos por colunas e identificados pela numeração (1 a 35) (cada um com a respectiva coloração). Em cada placa foram testados 10 amostras de DNA, distribuídas por linhas (linhas B a P), de modo a serem testadas para todos os *plexes*. Na primeira linha de cada placa (linha A) foi adicionado um controlo negativo de reacção, água bi-distilada estéril. Uma das amostras de DNA utilizada (linha B) correspondia a uma amostra utilizada como controlo negativo de mutações (amostra genotipada por sequenciação e sem mutações associadas à MH).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
J	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
L	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Q	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	25	30		
R	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	26	31		
S	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	27	32		
T	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	28	33		
U	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	29	34		

Figura 6.75 – Organização da placa de *iPLEX MassARRAY* com 35 *plexes* no Ensaio 3. Os *plexes* foram distribuídos por colunas, sendo identificados pela numeração (1 a 35) e pela respectiva coloração e as amostras de DNA distribuídas por linhas (linhas B a P). Na linha B encontra-se uma amostra de DNA sem mutações e na linha A encontra-se a amostra de controlo negativo (água bi-distilada estéril).

Da mesma forma que nos Ensaio 1 e 2, a análise das reacções de amplificação e extensão, de cada um dos conjuntos de *primers* relativos às 541 mutações e o porquê de terem sido retiradas mutações em vários *plexes*, foi realizada com base nos relatórios *Primer Adjustment Report* e *Plate Result Report*. Este primeiro relatório tem em conta a relação

inversamente proporcional entre a massa de cada analito e o seu valor de SNR. Idealmente, os valores de SNR de todos os *primers* devem ser ajustados a valores equivalentes para garantir o sucesso na reacção de extensão da mutação. Na mesma análise, foi utilizado o relatório *Plate Result Report* que fornece a descrição pormenorizada dos resultados de genotipagem, tendo em conta uma classificação baseada na significância estatística do alelo identificado (A – conservativo; B- Moderado; C- Agressivo; N- sem alelo; D- baixa probabilidade; E- *user call*). Idealmente os resultados deveriam ser A ou B.

Plex 1

O *plex 1* é constituído por 31 conjuntos de *primers*, dado que foram realocados para outros *plexes*, 6 conjuntos de *primers*. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.76A e 6.76B), constatou-se que ainda existem alguns conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*.

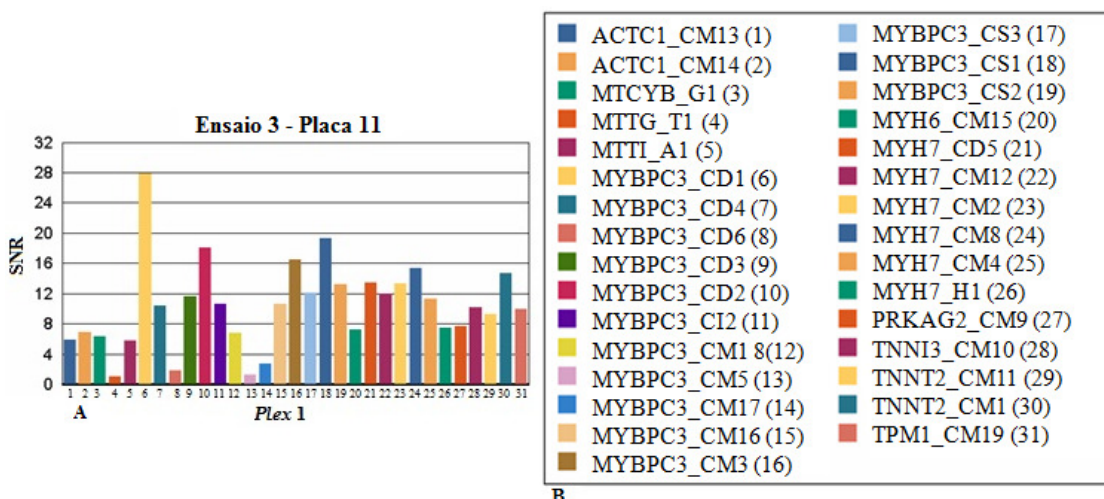


Figura 6.76 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 1 da Placa 11 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 31 mutações analisadas neste *plex 1*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 31 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 2), constatou-se que em 4 das mutações, a extensão foi insuficiente em todas as placas do Ensaio 3, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Por exemplo, a mutação T1 (posição nº 4 na Figura 6.76) para o gene *MTTG* possui um genótipo de baixa probabilidade (D) e um valor de extensão e SNR de 0,6 e 2, respectivamente. Enquanto as mutações CD6, CM5 e CM17 (posição nº 8, nº 13 e

nº 14 na Figura 6.76) no gene *MYBPC3* possuem um genótipo conservativo (A), o seu valor de SNR e de extensão continua reduzido, cerca de 2 e 3 e 1,5 a 2,0, respectivamente, mesmo com a optimização realizada no Ensaio 2. Por outro lado, também existem mutações que apresentam um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, apenas em algumas placas do ensaio. Por exemplo, as mutações CM13 (posição nº 1 na Figura 6.76) no gene *ACTC1* e CM18 (posição nº 12 na Figura 6.76) no gene *MYBPC3* apesar de não possuem genótipo identificado (sem alelos – N), o valor de SNR e de extensão melhorou de 3 e 0 para 5 e 6, respectivamente em relação ao Ensaio 2, bem como os valores de extensão. Tanto a mutação A1 (posição nº 5 na Figura 6.76) no gene *MTTI* como a CM14 (posição nº 2 na Figura 6.76) no gene *ACTC1* apresentam uma melhoria no valor de SNR de 0 e 2 para 6 e 7, respectivamente, como o valor de extensão nas duas de 0,3 para 1,4, respectivamente, contudo apresentam um genótipo de baixa probabilidade (D). Por outro lado, a mutação G1 (posição nº 3 na Figura 6.76) no gene *MTCYB* continua a apresentar um genótipo conservativo (A), um valor de SNR de 6 e um valor de extensão de 2,0.

Apesar de algumas mutações em algumas placas, apresentarem um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, mas com um genótipo conservativo (A), isto pode significar que pode ter ocorrido algum erro na pipetagem, dado que são realizadas manualmente e que as concentrações dos *primers* são ao nível do nanomolar e uma manipulação nesta escala, influencia o ensaio. Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem somente 9 em 31 conjuntos de *primers* por otimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação.

Plex 2

O *plex 2* é constituído por 36 conjuntos de *primers*, tendo sido apenas realocado um conjunto de *primers* para outro *plex*. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placados do Ensaio 3 (Figura 6.77A e 6.77B), constatou-se que existem alguns conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*.

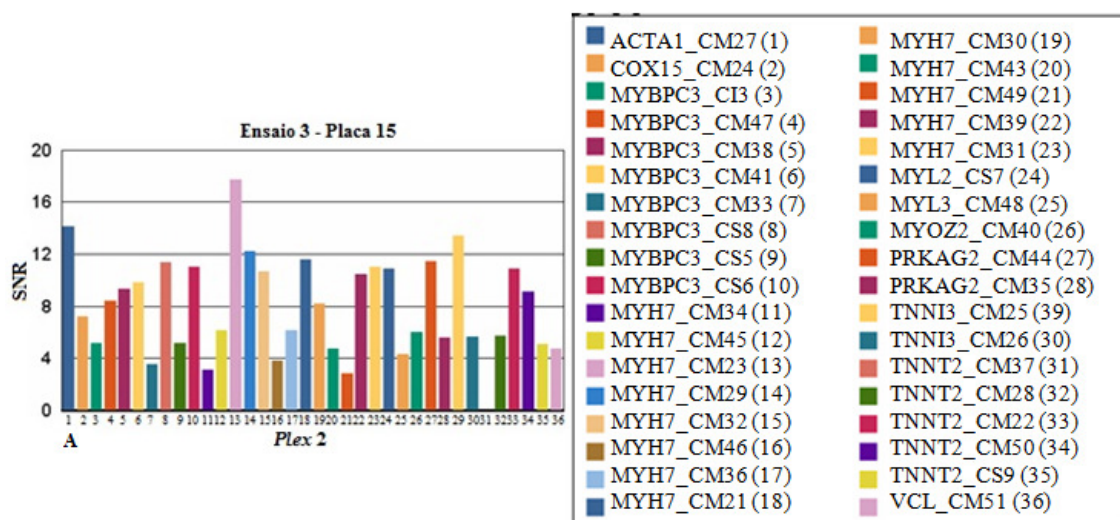


Figura 6.77 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 2 da Placa 15 do Ensaio 3. No eixo das abscissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 36 mutações analisadas neste *plex 2*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 36 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 4), constatou-se que em apenas numa das mutações, a extensão foi insuficiente em todas as placas do Ensaio 3, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. A mutação CM37 (posição nº 31 na Figura 6.77) no gene *TNNT2*, continua a apresentar um valor de SNR de 0 e um valor de extensão de 0,8, enquanto o genótipo atribuído continua a ser de baixa probabilidade (D). Por outro lado, também existem mutações que apresentam um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, apenas em algumas placas do ensaio. As mutações CM49 (posição nº 21 na Figura 6.84) no gene *MYH7*, CM34 (posição nº 11 na Figura 6.77) no gene *MYH7*, CM24 (posição nº 2 na Figura 6.77) no gene *COX15*, não apresentam um genótipo identificado (sem alelos – N), em que o valor de SNR e o de extensão manteve-se entre 5 e 6 e 0,9 e 0,5, respectivamente aquando a optimização do ensaio. As mutações CM46 (posição nº 16 na Figura 6.77) no gene *MYH7* e CM51 (posição nº 36 na Figura 6.77) no gene *VCL* apesar de possuírem um genótipo de baixa probabilidade (D), apresentaram melhorias as duas mutações com os mesmos valores, em relação ao valor de SNR e de extensão de 0 para 4 e de 0,1 para 1,3, respectivamente. Apesar das mutações CM33 (posição nº 7 na Figura 6.77), CM38 (posição nº 5 na Figura 6.77), CS8 (posição nº 8 na Figura 6.77) e CI3 (posição nº 3 na Figura 6.77) no gene *MYBPC3*; CM32 (posição nº 15 na Figura 6.77) no gene *MYH7* apresentam melhorias quanto ao genótipo atribuído de conservativo (A) e ao valor de SNR que varia, entre os 4 e os 11, mas os de extensão continuam reduzidos. Apesar de algumas mutações em algumas

placas, apresentarem um genótipo conservativo e depois um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, isto pode indicar que pode ter ocorrido algum erro na pipetagem, dado que são realizadas manualmente e que as concentrações dos *primers* são ao nível do nanomolar e uma manipulação nesta escala, influência o ensaio. Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem somente 11 em 36 conjuntos de *primers* por otimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 3

O *plex 3* é constituído por 34 conjuntos de *primers*, em que 3 conjuntos de *primers* foram transferidos de posição para outros *plexes*. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas (Figura 6.78A e 6.78B) do Ensaio 3, constatou-se que existem 21 conjuntos de *primers* apresenta um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo do SNR no *plex*.

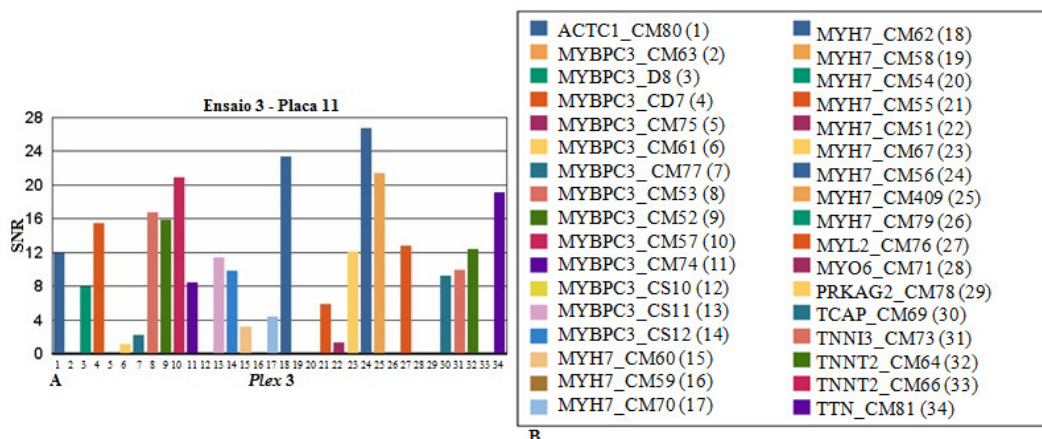


Figura 6.78 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 3 da Placa 15 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 34 mutações analisadas neste *plex 3*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 34 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 6), constatou-se que em todas as placas, existem um elevado número de conjuntos de *primers*, cerca de 21 com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, acompanhado com um valor de extensão nulo e sem genótipo

identificado na maioria das mutações. Apesar da optimização realizada neste *plex* não ter resultado, dado que continua a existir um elevado número de conjuntos de *primers* a necessitar de optimização, para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 4

O *plex* 4 é constituído por 34 conjuntos de *primers*, em que 3 conjuntos de *primers* foram realocados para outros *plexes*. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.79A e 6.79B), constatou-se que existem alguns conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR.

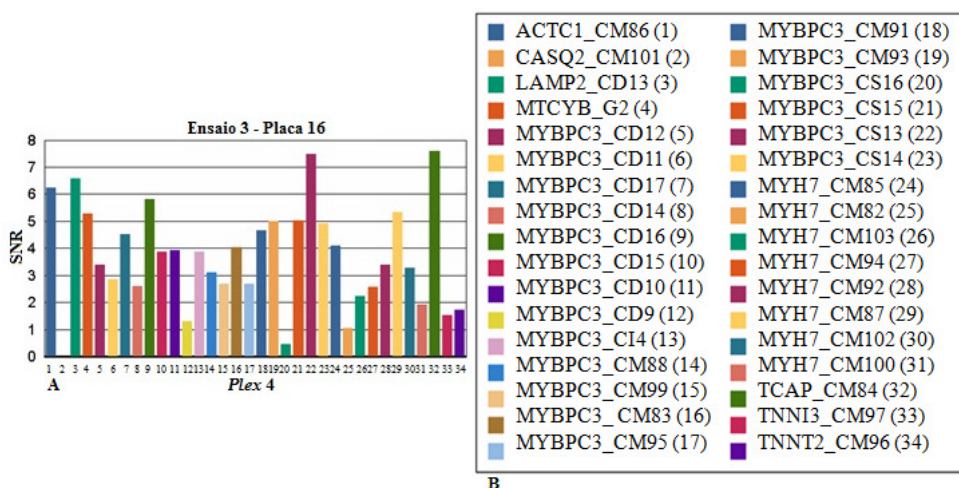


Figura 6.79 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 4 da Placa 16 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 34 mutações analisadas neste *plex* 4. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 34 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 8), constatou-se que em 8 das mutações, a extensão foi insuficiente em todas as placas do Ensaio 3, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Por exemplo, as mutações CM101 (posição nº 2 na Figura 6.86) no gene *CASQ2* e CD9 (posição nº 12 na Figura 6.79) no gene *MYBPC3*, apesar de apresentarem uma melhoria no valor de SNR de 1 e 5 para 12 e 6, respectivamente, o valor de extensão é de 0,4 e 0,3 respectivamente e o genótipo atribuído para ambas as mutações é de baixa probabilidade (D). A mutação CM97 (posição nº 33 na Figura 6.79) no gene *TNNI3* apresenta uma melhoria no valor de SNR de 2 para 10, contudo o valor de extensão é de 0,7,

apresentando apresenta um genótipo agressivo (C). Por outro lado, as mutações CS16 (posição nº 20 na Figura 6.79) no gene *MYBPC3*; CM82 (posição nº 25 na Figura 6.79) e CM100 (posição nº 31 na Figura 6.79) no gene *MYH7* e CM96 (posição nº 34 na Figura 6.79) no gene *TNNT2* além de não apresentam genótipo (sem alelos – N), tanto os valores de SNR como os de extensão pioraram, entre 3 e 8 para 0 e 3 e 0,6 para 0,4, respectivamente. Por último, a mutação CM88 (posição nº 14 na Figura 6.79) no gene *MYBPC3* apesar possuir um genótipo moderado (B), os valores de SNR e de extensão pioraram para valores nulos. Apesar desta mutação apresentar um genótipo moderado, continua a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo do *plex*, podendo ter ocorrido algum erro na pipetagem, dado que são realizadas manualmente e que as concentrações dos *primers* são ao nível do nanomolar e uma manipulação nesta escala, influência o ensaio. Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem somente 8 em 34 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 5

O *plex 5* é constituído por 33 conjuntos de *primers* e com o objectivo de optimizá-lo, 4 conjuntos de *primers* foram realocados para outros *plexes*. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas (Figura 6.80A e 6.80B), verificou-se que existem alguns conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*.

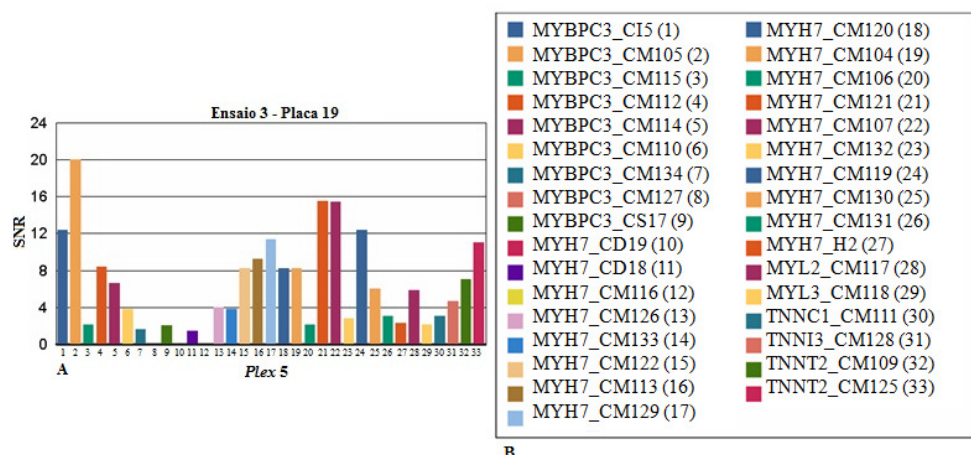


Figura 6.80 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 5 da Placa 19 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 33 mutações analisadas neste *plex* 5. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 33 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 10), constatou-se que em 9 das mutações, a extensão foi insuficiente nas placas 11 e 19 (são as únicas possíveis de analisar) do Ensaio 3, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Nas placas 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18 existe um elevado número de conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR. Nenhuma das mutações CM115 (posição nº 3 na Figura 6.80) no gene *MYBPC3*; CD19 (posição nº 10 na Figura 6.80), CM116 (posição nº 12 na Figura 6.80) no gene *MYH7*; CM118 (posição nº 29 na Figura 6.80) no gene *MYL3* e CM111 (posição nº 30 na Figura 6.80) no gene *TNNC1* não apresentam genótipo identificado (sem alelos – N), o valor de SNR piorou, de valores entre 3 e 7 para 0 e 3, respectivamente e os valores de extensão continuam nulos. As mutações CM110 (posição nº 6 na Figura 6.80) e CM134 (posição nº 7 na Figura 6.80) no gene *MYBPC3* e CD18 (posição nº 11 na Figura 6.87) e CM106 (posição nº 20 na Figura 6.80) no gene *MYH7* possuem um genótipo de baixa probabilidade (D), um valor de SNR baixo, entre 1 e 4 e valores de extensão nulos.

Por fim, existem 5 conjuntos de *primers* a apresentarem um genótipo conservativo (A), apenas na placa 19, referentes às mutações CM127 (posição nº 8 na Figura 6.80) e CS17 (posição nº 9 na Figura 6.80) no gene *MYBPC3*; CM132 (posição nº 23 na Figura 6.80), CM131 (posição nº 26 na Figura 6.80) e H2 (posição nº 27 na Figura 6.80) no gene *MYH7*. Apesar de algumas mutações em algumas placas, apresentarem um genótipo conservativo e depois um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR e um valor de extensão reduzido, isto pode indicar que pode ter ocorrido algum erro na pipetagem que tenha influenciado o passo de extensão, dado que a pipetagem é realizada manualmente e como a concentração dos *primers* é ao nível do nanomolar, ao ocorrer uma diminuição da sua concentração, o ensaio poderá ficar inviabilizado.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 14 em 33 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste

caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 6

O *plex 6* é constituído por 32 conjuntos de *primers*, sendo que 3 conjuntos de *primers* foram realocados nos *plexes*. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas no Ensaio 3 (Figura 6.81A e 6.81B), constatou-se que existem alguns conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*.

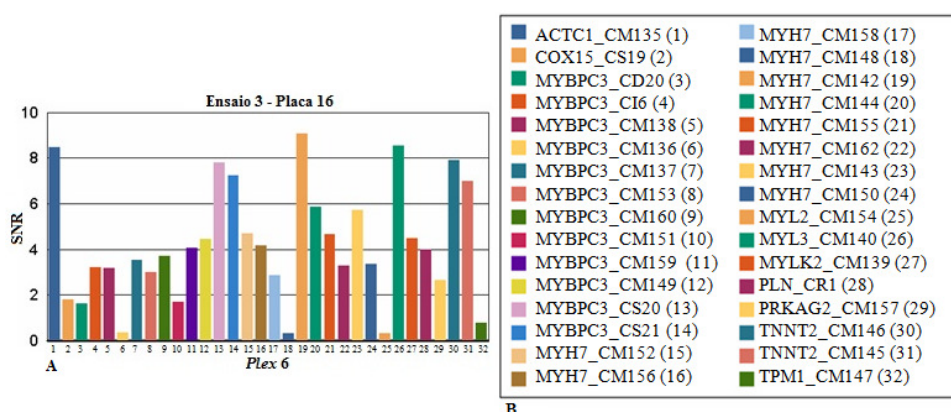


Figura 6.81 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 6 da Placa 16 do Ensaio 3. No eixo das abscissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 32 mutações analisadas neste *plex 6*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 32 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 12), constatou-se que em 5 das mutações, a extensão foi insuficiente em praticamente todas as placas do Ensaio 3, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Por exemplo, as mutações CD20 (posição nº 3 na Figura 6.81) no gene *MYBPC3* e CS19 (posição nº 2 na Figura 6.81) no gene *COX15* não possuem genótipo identificado (sem alelos – N) e o valor do SNR é baixo, valores entre 2 e 4, bem como os valores de extensão. Enquanto as mutações CM151 (posição nº 10 na Figura 6.88) no gene *MYBPC3* e CM136 (posição nº 6 na Figura 6.81) no gene *MYBPC3* apresentam um genótipo de baixa probabilidade (D), bem como os valores de SNR de 2 e 0, respectivamente e os valores de extensão nulos. A mutação CM154 (posição nº 25 na Figura 6.81) no gene *MYL2* possui um genótipo conservativo (A), mas um valor de SNR de 1 e um valor de extensão de 0,2. Existem mais 4 mutações que também apresentam um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, mas somente algumas placas do Ensaio e um valor de extensão entre 0,2 e 1,2. A mutação CM147 (posição nº 32 na Figura 6.81) no gene *TPM1*

possui um genótipo de baixa probabilidade (D), enquanto as mutações CM138 (posição nº 5 na Figura 6.81) e CS21 (posição nº 14 na Figura 6.81) no gene *MYBPC3*; CM143 (posição nº 23 na Figura 6.81) no gene *MYH7* não apresentam genótipo identificado (sem alelos – N). Apesar de algumas mutações apresentarem em algumas placas, genótipos conservativos, continuam a apresentar valores de SNR inferiores a 45% do valor máximo de SNR, podendo isto indicar que pode ter ocorrido algum erro na pipetagem, dado que são realizadas manualmente e que as concentrações dos *primers* são ao nível do nanomolar e uma manipulação nesta escala, influencia o ensaio. Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 9 em 32 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 7

O *plex 7* é constituído por 31 conjuntos de *primers*, sendo que 2 conjuntos de *primers* foram realocados para outro *plex*. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.82A e 6.82B), verificou-se que existem alguns conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*.

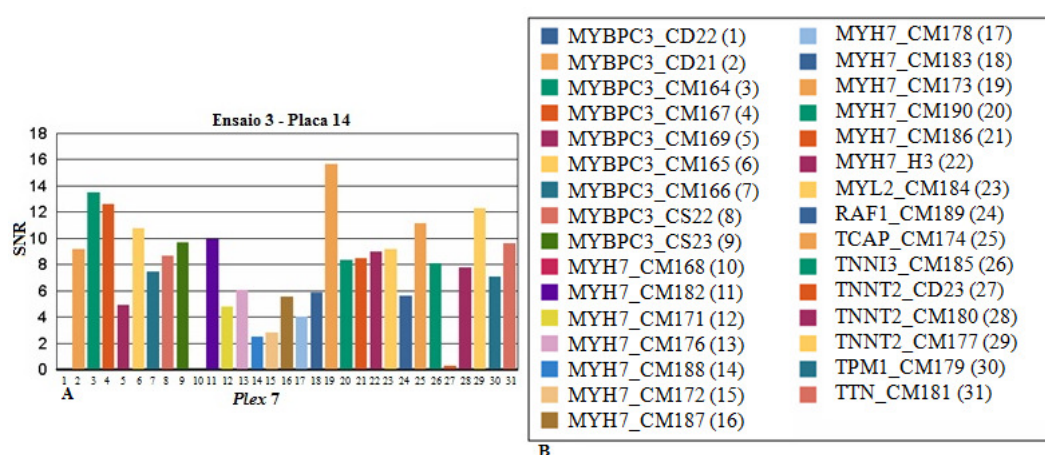


Figura 6.82 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 7 da Placa 14 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 30 mutações analisadas neste *plex 7*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 31 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 14), constatou-se que em 2 das mutações, a extensão foi insuficiente em todas as placas do Ensaio 3, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. As mutações CD22 (posição nº 1 na Figura 6.82) no gene *MYBPC3* e CM168 (posição nº 10 na Figura 6.82) no gene *MYH7* possuem um genótipo de baixa probabilidade (D) em todas as 9 placas do Ensaio e um valor nulo de SNR e de extensão que se manteve contante ao longo dos ensaios. A mutação CM169 (posição nº 5 na Figura 6.82) no gene *MYBPC3* apresenta um valor de SNR de 0 e um valor de extensão reduzido em apenas algumas das placas do ensaio, com um genótipo atribuído de baixa probabilidade (D), enquanto as mutações CM188 (posição nº 14 na Figura 6.82) no gene *MYH7* e CM185 (posição nº 26 na Figura 6.82) no gene *TNNI3* não apresentam genótipo identificado (sem alelos – N), apesar de ambas apresentarem um valor de SNR de 4.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 5 em 31 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 8

O *plex 8* é constituído por 30 conjuntos de *primers*, em que apenas um conjunto de *primers* foi realocado para outro *plex*. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.83A e 6.83B), constatou-se que apenas existem alguns conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*.

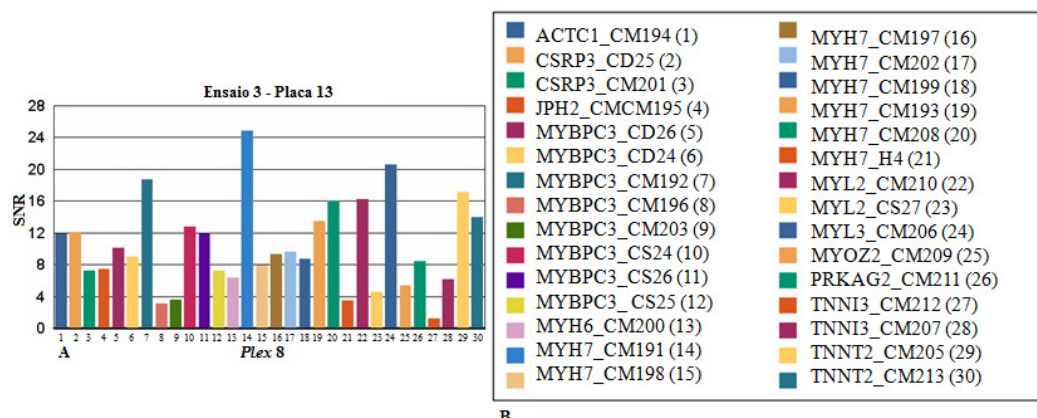


Figura 6.83 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 8 da Placa 13 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 30 mutações analisadas neste *plex 8*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 30 mutações nas placas do Ensaio 2 (Anexo 16), constatou-se que em 7 das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido, contudo não existe nenhum conjunto de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR em todas as placas do ensaio. Existem algumas mutações com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR em apenas algumas das placas do Ensaio. Por exemplo, as mutações CM212 (posição nº 27 na Figura 6.83) no gene *TNNI3* e a mutação H4 (posição nº 21 na Figura 6.83) no gene *MYH7* possuem um genótipo de baixa probabilidade (D) e um valor de SNR de 0 e 3, respectivamente e um valor de extensão nulo. Por outro lado, a mutação CM196 (posição nº 8 na Figura 6.83) no gene *MYBPC3* possui um valor de SNR de 4, contudo não apresenta genótipo identificado (sem alelos – N). A mutação CS27 (posição nº 23 na Figura 6.83) no gene *MYL2* possui um genótipo agressivo (C), com um valor de SNR de 4. Por outro lado, apesar das mutações CD24 (posição nº 6 na Figura 6.83) e CS26 (posição nº 11 na Figura 6.83) no gene *MYBPC3* possuírem um genótipo conservativo (A) e um valor de SNR aceitável de 5, apresentam valores de extensão reduzidos, enquanto a mutação CM209 (posição nº 25 na Figura 6.83) no gene *MYOZ2* um genótipo moderado (B), com um valor de SNR mais baixo. Apesar destas mutações apresentarem um genótipo conservativo, mas com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, isto pode indicar que tenha ocorrido algum erro na pipetagem, dado que são realizadas manualmente e que as concentrações dos *primers* são ao nível do nanomolar e uma manipulação nesta escala, influencia o ensaio.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 7 em 30 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 9

O *plex 9* é constituído por 30 conjuntos de *primers*, tendo sido realocados 2 conjuntos de *primers* para outro *plex*. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.84A e 6.84B), constatou-se que existem alguns conjuntos de *primers* apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR do *plex*.

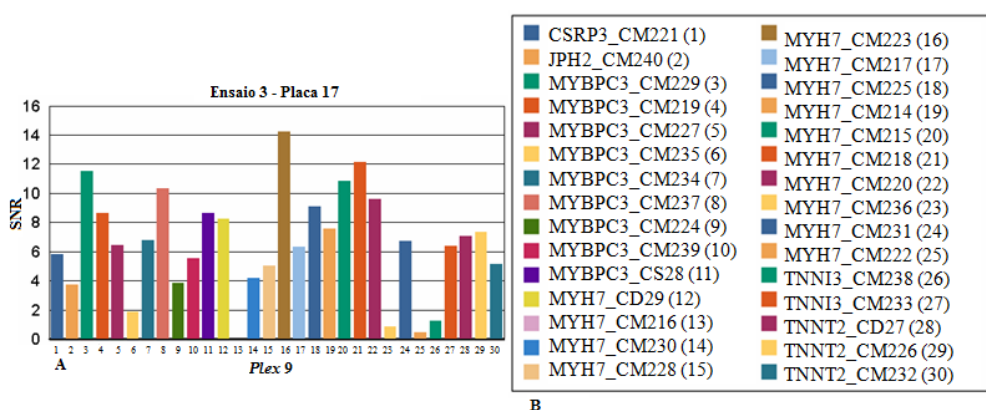


Figura 6.84 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex 9* da Placa 17 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 30 mutações analisadas neste *plex 9*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 30 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 18), constatou-se que apenas numa mutação, a extensão foi insuficiente em todas as placas do Ensaio 3, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Esta mutação CM216 (posição nº 13 na Figura 6.84) no gene *MYH7* possui um genótipo de baixa probabilidade (D) e um valor de SNR de 1. Além desta mutação, existem mais 8 conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, mas em apenas algumas placas do ensaio. Por exemplo, as mutações CM224 (posição nº 9 na Figura 6.84) e CM234 (posição nº 7 na Figura 6.84) no gene *MYBPC3*; CM238 (posição nº 26 na Figura 6.84) no gene *TNNI3* não

apresentam genótipo identificado (sem alelos – N) nem um valor de SNR aceitável, entre 2 e 3, enquanto a mutação CM235 (posição nº 6 na Figura 6.84) no gene *MYBPC3* possui um genótipo de baixa probabilidade (D) e um valor de SNR nulo. Por outro lado, as mutações CM221 (posição nº 1 na Figura 6.84) no gene *CSRP3*; CM222 (posição nº 25 na Figura 6.84) e CM236 (posição nº 23 na Figura 6.84) no gene *MYH7*; CM227 (posição nº 5 na Figura 6.84) no gene *MYBPC3* apresentam um genótipo conservativo (A), com um valor de SNR de 4. Apesar destas mutações apresentarem um genótipo conservativo, possuem um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, isto pode indicar que tenha ocorrido algum erro na pipetagem, dado que são realizadas manualmente e que as concentrações dos *primers* são ao nível do nanomolar e uma manipulação nesta escala, influencia o ensaio.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 9 em 30 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 10

O *plex* 10 é constituído por 28 conjuntos de *primers*, em que apenas um conjunto de *primers* para a mutação DB2 no gene *MYBPC3* foi realocada noutros *plexes*. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.85A e 6.85B), constatou-se que existem alguns conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*.

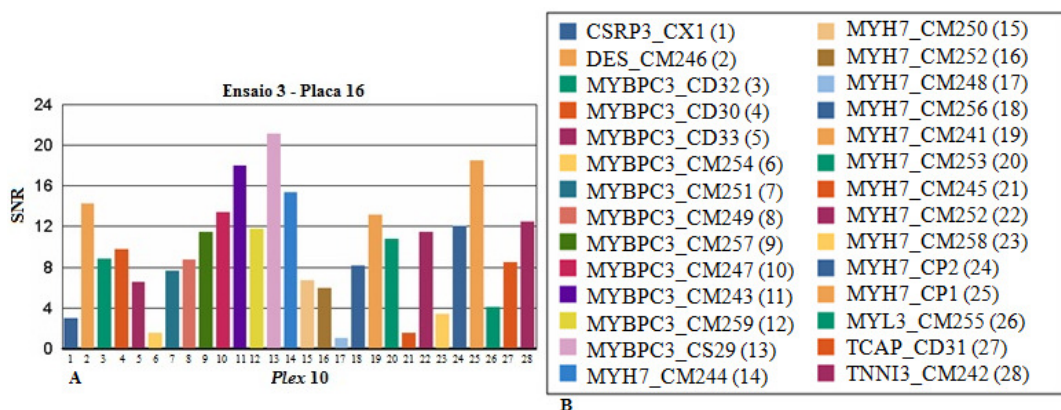


Figura 6.85 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 10 da Placa 16 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 28 mutações analisadas neste *plex* 10. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 28 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 20), constatou-se que em 8 das mutações, a extensão foi insuficiente em algumas placas, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Por exemplo, as mutações CM248 (posição nº 17 na Figura 6.85) e CP2 (posição nº 24 na Figura 6.85) no gene *MYH7* e CM254 (posição nº 6 na Figura 6.85) no gene *MYBPC3* apresentam um genótipo agressivo (C) e um valor de SNR entre 0 e 2. As mutações CM258 (posição nº 23 na Figura 6.85) e CM244 (posição nº 14 na Figura 6.85) no gene *MYH7*; CM249 (posição nº 8 na Figura 6.85) no gene *MYBPC3* e CM255 (posição nº 26 na Figura 6.85) no gene *MYL3* apresentam um genótipo de baixa probabilidade (D), com um SNR entre 4 e 8, enquanto a CX1 (posição nº 1 na Figura 6.85) no gene *CSRP3* possui um genótipo conservativo (A). Apesar destas mutações apresentarem um genótipo conservativo, mas com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, isto pode indicar que tenha ocorrido algum erro na pipetagem, dado que são realizadas manualmente e que as concentrações dos *primers* são ao nível do nanomolar e uma manipulação nesta escala, influencia o ensaio.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 8 em 28 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 11

O *plex* 11 é constituído por 27 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas no Ensaio 3 (Figura 6.86A e 6.86B), verificou-se que existem alguns conjuntos de *primers* a apresentar um valor inferior a 45% do valor máximo de SNR do *plex*. Nenhum conjunto de *primers* deste *plex* foi alterado de posição para outro *plex*.

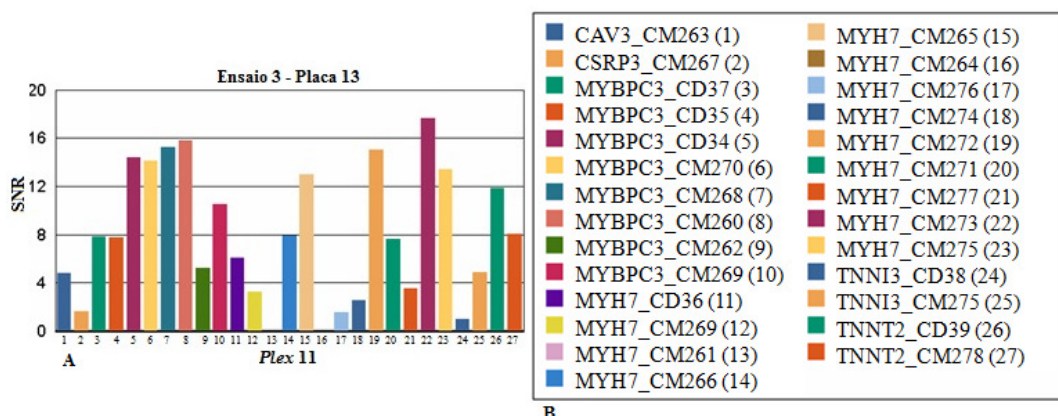


Figura 6.86 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 11 da Placa 13 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 27 mutações analisadas neste *plex* 11. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 27 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 22), constatou-se que em 2 das mutações, a extensão foi insuficiente em todas as placas do ensaio, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. As mutações CM264 (posição nº 16 na Figura 6.86) e CM274 (posição nº 18 na Figura 6.86) no gene *MYH7* possuem um genótipo de baixa probabilidade (D) e agressivo (C) e um valor de SNR baixo, de 1 e 2, respectivamente, apesar de apresentarem um valor de extensão aceitável. Contudo, existem mais 10 conjuntos de *primers* com um valor de extensão inferior a 45% do valor máximo de SNR em apenas algumas placas do ensaio. Por exemplo, a mutação CM263 (posição nº 1 na Figura 6.86) no gene *CAV3* não apresenta genótipo identificado (sem alelos – N), mas possui um valor de SNR de 4, enquanto as mutações CM261 (posição nº 13 na Figura 6.86), CM266 (posição nº 14 na Figura 6.86) CM269 (posição nº 12 na Figura 6.86) e CM277 (posição nº 21 na Figura 6.86) no gene *MYH7* possuem um genótipo de baixa probabilidade (D) e um valor de SNR aceitável, valores entre 4 e 8. Por outro lado, as mutações CM267 (posição nº 2 na Figura 6.86) no gene *CSRP3*; CD38 (posição nº 24 na Figura 6.86) no gene *TNNI3*; CM276 (posição nº 17 na Figura 6.86) e CM274 (posição nº 18 na Figura 6.86) no gene *MYH7* apresentam um genótipo conservativo (A) e um valor de SNR aceitável, de 3 a 10, contudo apresentam valores de extensão nulos. Apesar destas mutações apresentarem um genótipo conservativo, mas com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, isto pode indicar que tenha ocorrido algum erro na pipetagem, dado que são realizadas manualmente e que as concentrações dos *primers* são ao nível do nanomolar e uma manipulação nesta escala, influencia o ensaio.

Ao avaliar a otimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 12 em 27 conjuntos de *primers* por otimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de otimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 12

O *plex* 12 é constituído por 24 conjuntos de *primers*, tendo sido realocado apenas um conjunto de *primers*. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.87A e 6.87B), constatou-se que existem alguns conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*.

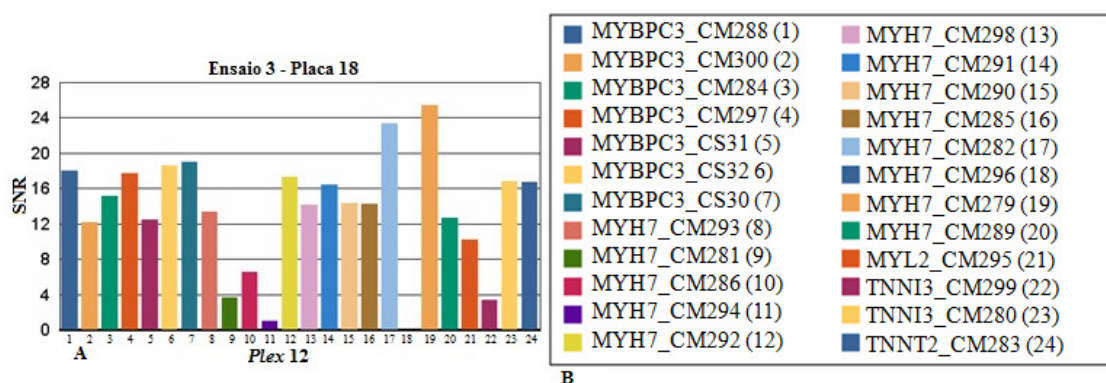


Figura 6.87 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 12 da Placa 18 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 24 mutações analisadas neste *plex* 12. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 24 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 24), constatou-se que em 2 das mutações, a extensão foi insuficiente em todas as placas, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Por exemplo, a mutação CM296 (posição nº 18 na Figura 6.87) no gene *MYH7* não apresenta genótipo identificado (sem alelos – N), enquanto a mutação CM299 (posição nº 22 na Figura 6.87) no gene *TNNI3* possui um genótipo conservativo (A), contudo ambas apresentam um valor de SNR de 3 e 2, respectivamente e valores de extensão nulos. Contudo, existem mais 5 conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR em apenas algumas placas do ensaio. A mutação CM281 (posição nº 9 na Figura 6.94) no gene *MYH7* possui um genótipo de baixa probabilidade (D), com um valor de

SNR de 4 enquanto a mutação CM294 (posição nº 11 na Figura 6.87) no gene *MYH7* não tem o genótipo identificado (sem alelos – N), possuindo um valor de SNR de 3. Por outro lado, as mutações CM296 (posição nº 18 na Figura 6.87) no gene *MYH7* e CM299 (posição nº 22 na Figura 6.87) no gene *TNNI3* possuem um genótipo conservativo (A), mas um valor de SNR de 4 e 3, respectivamente, enquanto a mutação CM281 (posição nº 4 na Figura 6.87) no gene *MYH7* possui um genótipo moderado (B), com um valor de SNR de 3. Apesar destas mutações apresentarem um genótipo conservativo, mas com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, isto pode indicar que tenha ocorrido algum erro na pipetagem, dado que são realizadas manualmente e que as concentrações dos *primers* são ao nível do nanomolar e uma manipulação nesta escala, influencia o ensaio.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 7 em 24 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 13

O *plex* 13 é constituído por 24 conjuntos de *primers*, onde apenas um conjunto de *primers* foi realocado para outro *plex*. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.88A e 6.88B), constatou-se que existem alguns conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*.

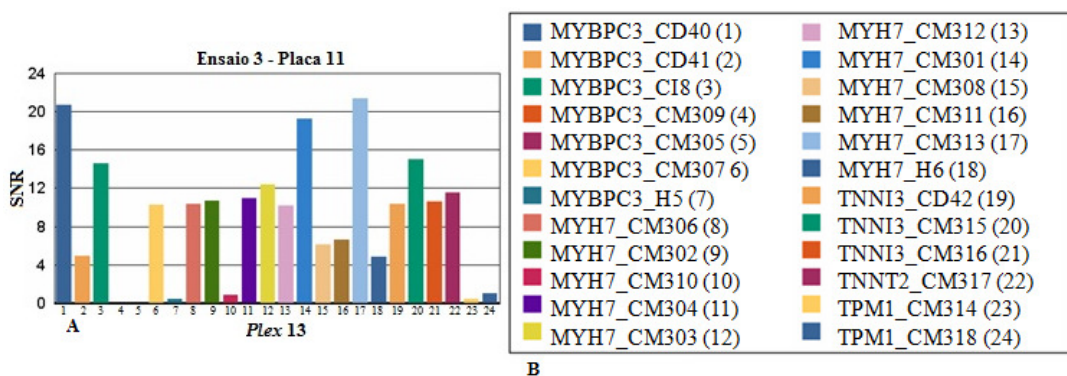


Figura 6.88 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex* 13 da Placa 11 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 24 mutações analisadas neste *plex* 13. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 24 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 26), constatou-se que em 3 das mutações, a extensão foi insuficiente na maioria das placas, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. As três mutações CM305 (posição nº 5 na Figura 6.88) no gene *MYBPC3*; CM314 (posição nº 23 na Figura 6.88) e CM318 (posição nº 24 na Figura 6.88) no gene *TPM1*, apesar de apresentarem um genótipo conservativo (A), possuem um valor de SNR de 2, 0 e 1, respectivamente. Contudo, existem mais 4 conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR em apenas algumas placas do ensaio. Por exemplo, a mutação CM309 (posição nº 4 na Figura 6.88) no gene *MYBPC3* possui um genótipo de baixa probabilidade (D) e um valor de SNR de 5, enquanto a mutação H6 (posição nº 18 na Figura 6.88) no gene *MYH7* não possui o genótipo identificado (sem alelos – N), tendo um valor de SNR de 3. Por outro lado, as mutações CM308 (posição nº 15 na Figura 6.88) no gene *MYH7* e CD41 (posição nº 2 na Figura 6.88) no gene *MYBPC3* possuem um genótipo conservativo (A), apesar do valor de SNR ser 0 e 3, respectivamente. Apesar destas mutações apresentarem um genótipo conservativo, mas com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, isto pode indicar que tenha ocorrido algum erro na pipetagem, dado que são realizadas manualmente e que as concentrações dos *primers* são ao nível do nanomolar e uma manipulação nesta escala, influencia o ensaio.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 7 em 24 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 14

O *plex 14* é constituído por 22 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas no Ensaio 3 (Figura 6.89A e 6.89B), verificou-se que existem alguns conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*. Foi recolocada uma mutação anteriormente retirada.

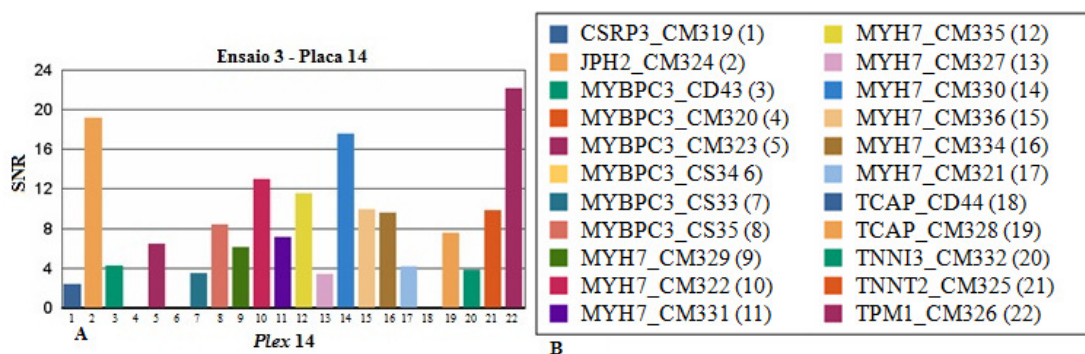


Figura 6.89 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 14 da Placa 14 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 22 mutações analisadas neste *plex* 14. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 22 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 28), constatou-se que em 2 das mutações, a extensão foi insuficiente em todas as placas do ensaio, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. As mutações CM320 (posição nº 4 na Figura 6.89) no gene *MYBPC3* e CD44 (posição nº 18 na Figura 6.89) no gene *TCAP* possuem um genótipo conservativo (A) e de baixa probabilidade (D), respectivamente e um valor de SNR nulo em ambas. Contudo, existem mais 6 conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR em apenas algumas placas do ensaio. Ambas as mutações CD43 (posição nº 3 na Figura 6.96) no gene *MYBPC3* e CM319 (posição nº 1 na Figura 6.89) no gene *CSRP3* possuem um genótipo de baixa probabilidade (D) e um valor de SNR de 4. Por outro lado, as mutações CS34 (posição nº 6 na Figura 6.89) e CS33 (posição nº 7 na Figura 6.89) no gene *MYBPC3*; CM320 (posição nº 4 na Figura 6.89) e CM327 (posição nº 13 na Figura 6.89) no gene *MYH7* possuem um genótipo conservativo (A) e um valor de SNR aceitável entre 4 e 6, contudo valores de extensão nulos. Apesar destas mutações apresentarem um genótipo conservativo, mas com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, isto pode indicar que tenha ocorrido algum erro na pipetagem, dado que são realizadas manualmente e que as concentrações dos *primers* são ao nível do nanomolar e uma manipulação nesta escala, influencia o ensaio.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 8 em 24 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste

caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 15

O *plex* 15 é constituído por 19 conjuntos de *primers* ao analisar os valores de extensão dos conjuntos de *primers* das placas no Ensaio 3 (Figura 6.90A e 6.90B), verificou-se que existem alguns conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*. Foi recolocada uma mutação anteriormente retirada.

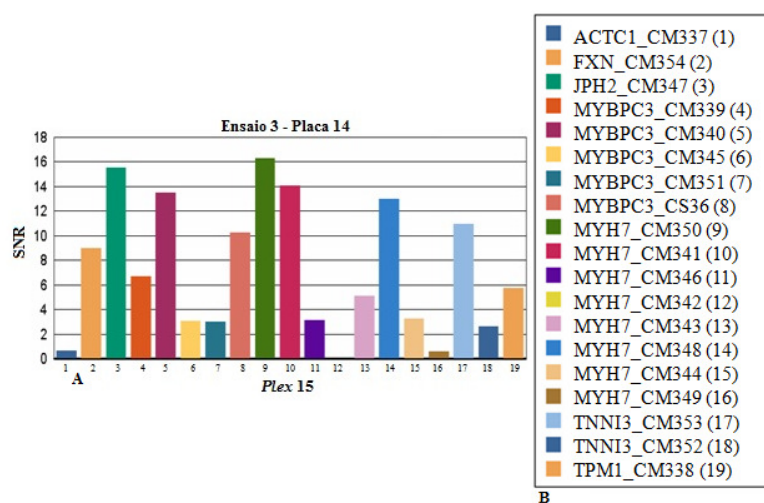


Figura 6.90 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 15 da Placa 14 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 19 mutações analisadas neste *plex* 15. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 19 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 30), constatou-se que em 2 das mutações, a extensão foi insuficiente em todas as placas do ensaio, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. A mutação CM337 (posição nº 1 na Figura 6.90) no gene *ACTC1* possui um genótipo de baixa probabilidade (D), com um valor de SNR de 2, enquanto a mutação CM342 (posição nº 12 na Figura 6.90) no gene *MYH7* não apresentava genótipo identificado (sem alelos – N) e o valor de SNR era nulo. Contudo, existem mais 8 conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR em apenas algumas placas do ensaio. As mutações CM352 (posição nº 18 na Figura 6.90) no gene *TNNI3*; CM351 (posição nº 7 na Figura 6.97), CM345 (posição nº 6 na Figura 6.90) no gene *MYBPC3*; CM344 (posição nº 15 na Figura 6.90), CM346 (posição nº 11 na Figura 6.90), CM349 (posição nº 16 na Figura 6.90) e CM343 (posição nº 13 na Figura 6.90) no gene *MYH7* apresentam um

genótipo conservativo (A), com um valor de SNR entre 2 e 12, contudo valores de extensão reduzidos, enquanto a mutação CM388 (posição nº 19 na Figura 6.90) no gene *TPM1* possui um genótipo moderado (B), com um valor de SNR de 8 e um de extensão de 0,5. Apesar destas mutações apresentarem um genótipo conservativo, mas com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, isto pode indicar que tenha ocorrido algum erro na pipetagem, dado que são realizadas manualmente e que as concentrações dos *primers* são ao nível do nanomolar e uma manipulação nesta escala, influencia o ensaio.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 10 em 19 conjuntos de *primers* por otimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 16

O *plex* 16 é constituído por 15 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.91A e 6.91B), verificou-se que existem alguns conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *Plex*. Foi recolocada uma mutação anteriormente retirada

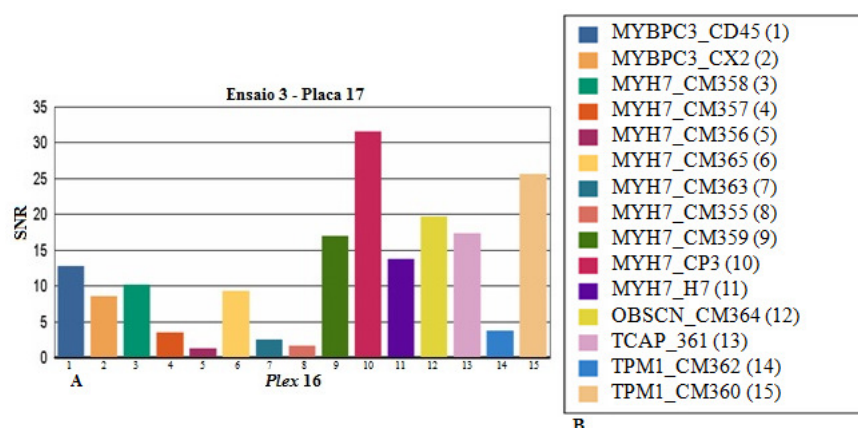


Figura 6.91 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 16 da Placa 17 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 15 mutações analisadas neste *plex* 16. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 15 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 32), constatou-se que apenas numa das mutações, a

extensão foi insuficiente em todas as placas do ensaio, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Esta é referente à mutação CM356 (posição nº 5 na Figura 6.91) no gene *MYH7* com um genótipo conservativo (A), contudo possui um valor de SNR de 0. Existem mais 3 conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR em apenas algumas placas do ensaio. Por exemplo, a mutação CM355 (posição nº 8 na Figura 6.91) no gene *MYH7* possui um genótipo de baixa probabilidade (D) e um valor de SNR de 1, enquanto as mutações CM357 (posição nº 4 na Figura 6.91) e CM363 (posição nº 7 na Figura 6.91) no gene *MYH7* possuem um genótipo conservativo (A), mas ambas com um valor de SNR de 3. Apesar destas mutações apresentarem um genótipo conservativo, mas com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, isto pode indicar que tenha ocorrido algum erro na pipetagem, dado que são realizadas manualmente e que as concentrações dos *primers* são ao nível do nanomolar e uma manipulação nesta escala, influencia o ensaio.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 4 em 15 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 17

O *plex 17* é constituído por 14 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas no Ensaio 3 (Figura 6.92A e 6.92B), constatou-se que existem apenas 3 conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*. Foi recolocada uma mutação anteriormente retirada

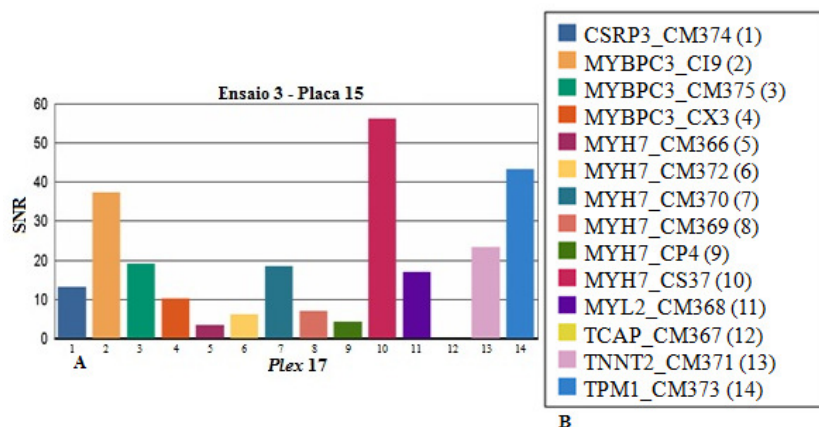


Figura 6.92 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 17 da Placa 15 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 15 mutações analisadas neste *plex* 17. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 14 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 34), constatou-se que apenas numa das mutações, a extensão foi insuficiente em todas as placas, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Esta é referente à mutação CM367 (posição nº 12 na Figura 6.92) no gene *TCAP* com um genótipo atribuído de baixa probabilidade (D) e um valor de 15. Contudo, existem mais 2 conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR e um valor de extensão reduzido em apenas algumas placas do ensaio. Por exemplo, a mutação CM366 (posição nº 5 na Figura 6.92) no gene *MYH7* possui um genótipo agressivo (C) com um valor de SNR de 3, enquanto a mutação CX3 (posição nº 4 na Figura 6.92) no gene *MYBPC3* possui um genótipo de baixa probabilidade (D), com um valor de SNR de 5.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 4 em 15 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 18

O *plex* 18 é constituído por 11 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.93A e 6.93B), constatou-se que

existem alguns conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR do *plex*. Foram recolocadas duas mutações anteriormente retiradas.

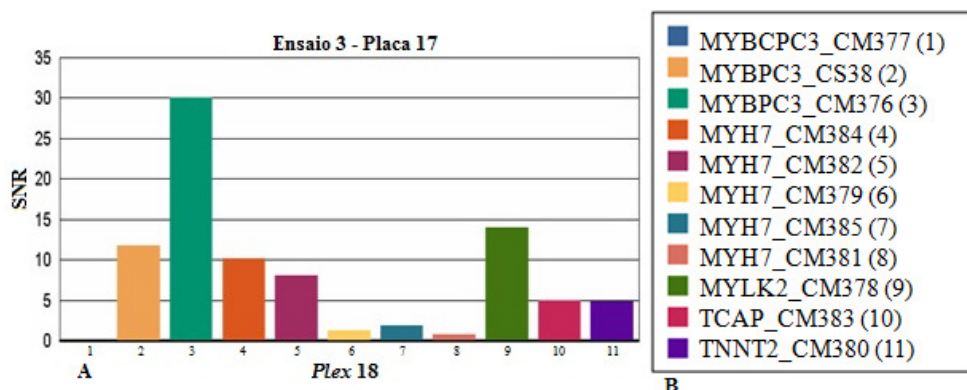


Figura 6.93 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 18 da Placa 17 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 11 mutações analisadas neste *plex* 18. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 11 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 36), constatou-se que em 3 das mutações, a extensão foi insuficiente em todas as placas do ensaio, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. As mutações CM379 (posição nº 6 na Figura 6.93) no gene *MYH7* e CM381 (posição nº 8 na Figura 6.93) no gene *MYH7* possuem um genótipo de baixa probabilidade (D) e conservativo (A), respectivamente, com um valor de SNR ambas nulo enquanto a mutação CM377 (posição nº 1 na Figura 6.93) no gene *MYBPC3* não apresenta genótipo identificado (sem alelos – N) e também apresenta um valor de SNR nulo. Contudo, existe mais um conjunto de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR em apenas algumas placas do ensaio, referente à mutação CM385 (posição nº 7 na Figura 6.93) no gene *MYH7*, apresentando um genótipo conservativo (A), mas um valor de SNR de 3. Apesar destas mutações apresentarem um genótipo conservativo, mas com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, isto pode indicar que tenha ocorrido algum erro na pipetagem, dado que são realizadas manualmente e que as concentrações dos *primers* são ao nível do nanomolar e uma manipulação nesta escala, influencia o ensaio.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 4 em 11 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste

caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 19

O *plex* 19 é constituído por 6 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* da placa 12 no Ensaio 3 (Figura 6.94A e 6.94B), verificou-se que existem apenas 2 conjuntos de *primers* com um valor de SNR elevado, ou seja, os restantes apresentam um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR do *plex*. Foram recolocadas duas mutações anteriormente retiradas.

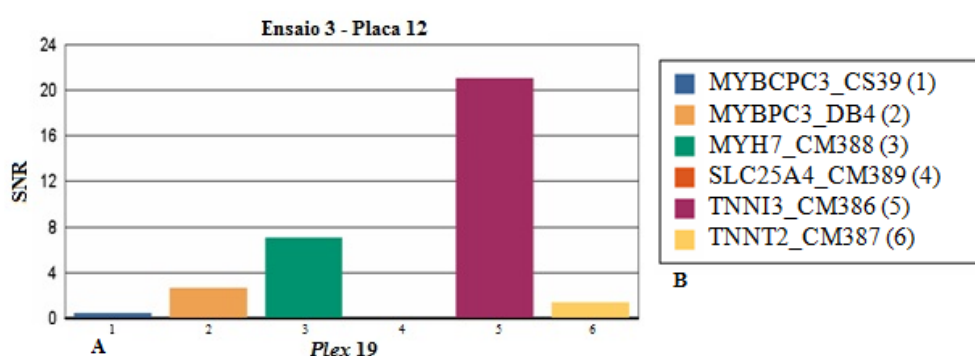


Figura 6.94 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 19 da Placa 12 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 6 mutações analisadas neste *plex* 19. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 6 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 38), constatou-se que apenas numa das mutações, a extensão foi insuficiente em todas as placas do ensaio, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. A mutação CM387 (posição nº 6 na Figura 6.94) no gene *TNNT2* possui um genótipo de baixa probabilidade (D), com um valor de SNR nulo. Contudo, existem mais 3 conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR em apenas algumas placas do ensaio. Por exemplo, a mutação CM389 (posição nº 4 na Figura 6.94) no gene *SLC25A4* possui um genótipo agressivo (C), apesar do valor de SNR ser 5, enquanto as mutações CS39 (posição nº 1 na Figura 6.94) e DB4 (posição nº 2 na Figura 6.94) no gene *MYBPC3* possuem um genótipo de baixa probabilidade (D), com um valor de SNR de 5 e 6, respectivamente.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 4 em 6 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização

futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 20

O *plex 20* é constituído por 5 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.95A e 6.95B), verificou-se que apresenta apenas 3 conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*. Foi recolocada a mutação anteriormente retirada.

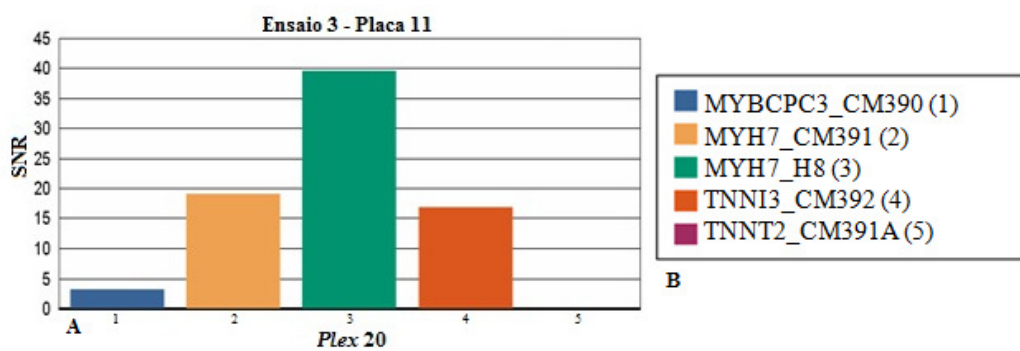


Figura 6.95 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex 20* da Placa 11 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 6 mutações analisadas neste *plex 20*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 5 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 40), constatou-se que apenas numa das mutações, a extensão foi insuficiente para todas as placas do ensaio, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. A mutação CM391A (posição nº 5 na Figura 6.95) no gene *TNNT2* possui um genótipo com baixa probabilidade (D) com um valor de SNR de 2. Contudo, existem mais 2 conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR em apenas algumas placas do ensaio. Por exemplo, a mutação H8 (posição nº 3 na Figura 6.95) no gene *MYH7* apresenta um genótipo de baixa probabilidade (D) com um valor de SNR de 2, enquanto a mutação CM391 (posição nº 2 na Figura 6.95) no gene *MYH7* possuem um genótipo conservativo (A) e um valor de SNR de 3. Apesar destas mutações apresentarem um genótipo conservativo, mas com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, isto pode indicar que tenha ocorrido algum erro na pipetagem, dado

que são realizadas manualmente e que as concentrações dos *primers* são ao nível do nanomolar e uma manipulação nesta escala, influencia o ensaio.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 3 em 5 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 21

O *plex 21* é constituído exclusivamente por um conjunto de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3, verificou-se que este apresenta um valor de SNR de 40, com um genótipo conservativo (A) e um valor de extensão excelente, de 40. Este *plex* pode ser considerado optimizado.

Plex 22

O *plex 22* é constituído por 6 conjuntos de *primers* alocados de outros *plexes* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.96A e 6.96B), verificou-se que existem apenas 2 conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*. Foi recolocada a mutação anteriormente retirada.

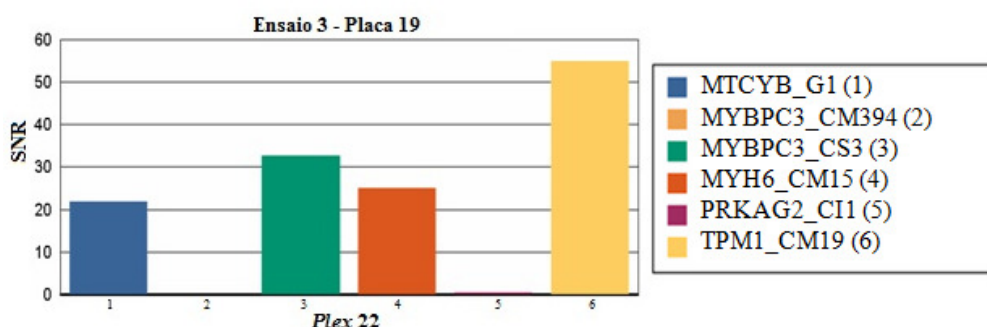


Figura 6.96 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex 22* da Placa 19 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 6 mutações analisadas neste *plex 22*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 6 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 44), constatou-se que em 2 das mutações, a extensão foi insuficiente em todas as placas do ensaio, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. As mutações CM394 (posição nº 2 na Figura 6.96) no gene *MYBPC3* e CI10 (posição nº 5 na Figura 6.96) no gene *PRKAG2* não apresentam genótipo identificado (sem alelos – N), com um valor de SNR nulo e valores de extensão reduzidos.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 2 em 6 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 23

O *plex 23* é constituído por 4 conjuntos de *primers* alocados de outros *plexes* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* da placa 15 do Ensaio 3 (Figura 6.97A e 6.97B), verificou-se que todos os conjuntos de *primers* apresentam um valor de SNR elevado.

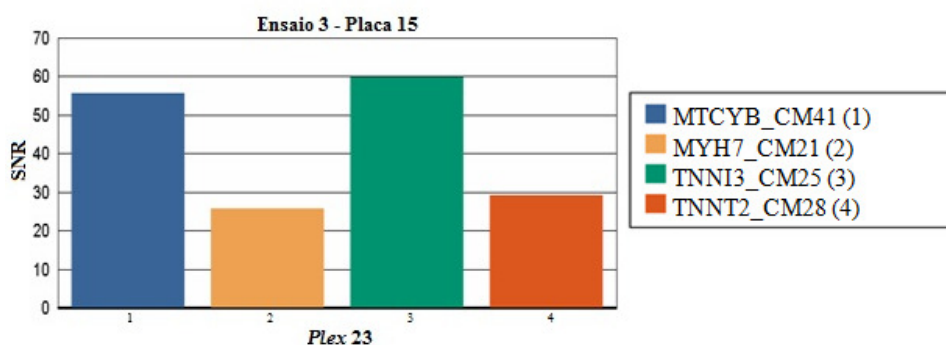


Figura 6.97 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex 23* da Placa 15 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 4 mutações analisadas neste *plex 23*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 4 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 46), constatou-se que em todas as mutações, o valor de SNR é elevado. Contudo as mutações CM41 (posição nº 1 na Figura 6.97) no gene *MTCYB*; CM21 (posição nº 2 na Figura 6.97) no gene *MYH7* e CM28 (posição nº 4 na Figura 6.104) no gene *TNNT2* apresentam um genótipo com baixa probabilidade (D), enquanto a

mutação CM25 (posição nº 3 na Figura 6.97) no gene *TNNI3* não apresenta genótipo identificado (sem alelos – N). Ou seja, este *plex* apesar de possuir valores de SNR elevados, derivado a algum erro que possa ter ocorrido (como a pipetagem é realizada manualmente, pode ter ocorrido algum erro, dada esta ser manual e como a concentração dos *primers* é ao nível nanomolar, uma manipulação a esta escala influencia o ensaio), não apresenta os genótipos ideais. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 24

O *plex 24* é constituído por 7 conjuntos de *primers* alocados de outros *plexes* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.98A e 6.98B), verificou-se que existem 2 conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*. Foram recolocadas as duas mutações anteriormente retiradas.

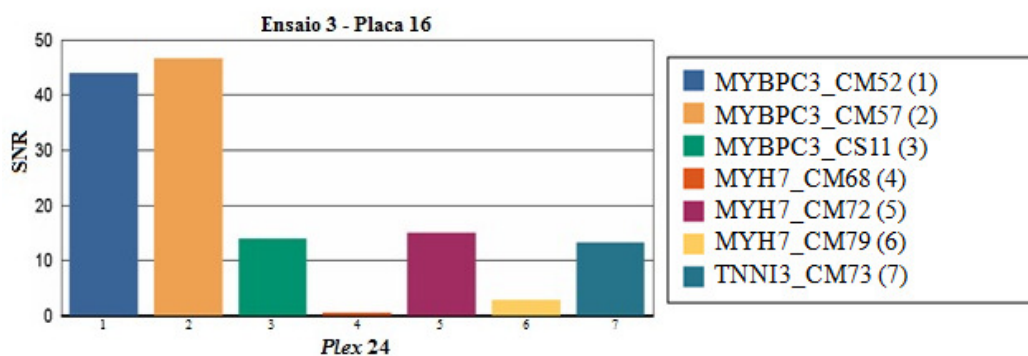


Figura 6.98 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 24 da Placa 14 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 7 mutações analisadas neste *plex 24*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 7 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 48), constatou-se que em 2 das mutações, a extensão foi insuficiente em todas as placas do ensaio, em sintonia com a baixa significância estatística

do genótipo obtido. As mutações CM68 (posição nº 4 na Figura 6.98) no gene *MYH7* e CM79 (posição nº 6 na Figura 6.98) no gene *MYH7*, ambas não possuem o genótipo identificado (sem alelos –N), bem como um valor de SNR nulo.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 2 em 7 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 25

O *plex 25* é constituído por 5 conjuntos de *primers* alocados de outros *plexes* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* da placa 16 do Ensaio 3 (Figura 6.99A e 6.99B), constatou-se que todos os conjuntos de *primers* apresentam um valor de SNR elevados. Foi recolocada a mutação anteriormente retirada.

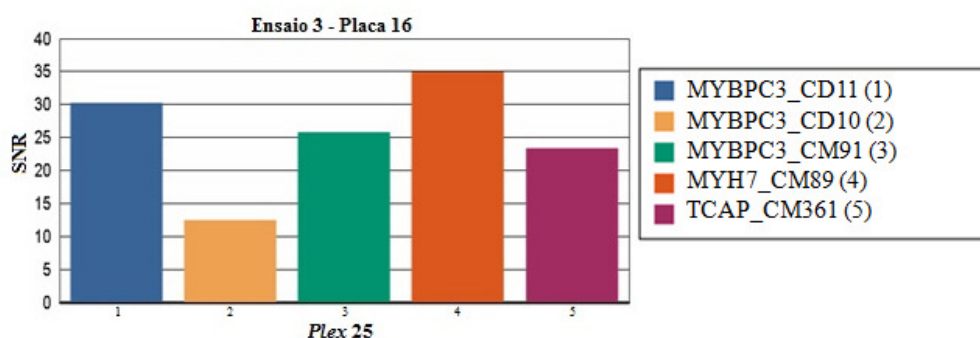


Figura 6.99 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 25 da Placa 16 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 5 mutações analisadas neste *plex 25*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 5 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 50), constatou-se que em todas as mutações, a extensão foi elevada, contudo as mutações CD11 (posição nº1 na Figura 6.99), CD10 (posição nº 2 na Figura 6.99) e CM91 (posição nº 3 na Figura 6.99) no gene *MYBPC3* apresentam genótipo atribuído de baixa probabilidade (D), enquanto as outras duas mutações CM89 (posição nº 4 na Figura 6.99) no gene *MYH7* e CM361 (posição nº 5 na Figura 6.99) no gene *TCAP* não possuem genótipo identificado (sem alelos – N). Ou seja, este *plex* apesar de

possuir valores de SNR elevados, derivado a algum erro que possa ter ocorrido (como a pipetagem é realizada manualmente, pode ter ocorrido algum erro e como a concentração dos *primers* é ao nível nanomolar, uma manipulação a esta escala influencia o ensaio), não apresenta os genótipos ideais. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 26

O *plex 26* é constituído por 12 conjuntos de *primers* alocados de outros *plexes* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.100A e 6.100B), verificou-se que existem 2 conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*. Foram recolocadas 7 mutações anteriormente retiradas.

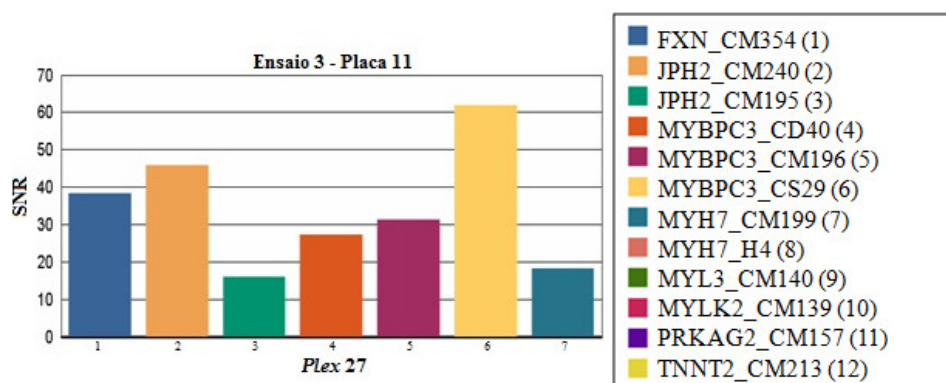


Figura 6.100 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 26 da Placa 11 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 12 mutações analisadas neste *plex 26*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 12 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 52), constatou-se que em 2 das mutações, a extensão foi insuficiente em todas as placas, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. Além de apresentarem um valor de SNR razoável, as mutações CM354 (posição nº 1 na Figura 6.100) no gene *FXN* com um genótipo com baixa probabilidade (D) e a mutação CM139 (posição nº 10 na Figura 6.100) no gene *MYLK2* com um genótipo agressivo (C). Ou seja, este *plex* apesar de possuir valores de SNR elevados, derivado a algum erro que possa ter ocorrido (como a pipetagem é realizada manualmente, pode ter ocorrido algum erro, dada esta ser manual e como a concentração dos *primers* é ao nível nanomolar,

uma manipulação a esta escala influencia o ensaio), não apresenta os genótipos ideais. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 27

O *plex 27* é constituído por 7 conjuntos de *primers* alocados de outros *plexes* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.101A e 6.101B) verificou-se que todos os conjuntos de *primers* apresentam valores de SNR elevados. Foram recolocadas 5 mutações anteriormente retiradas.

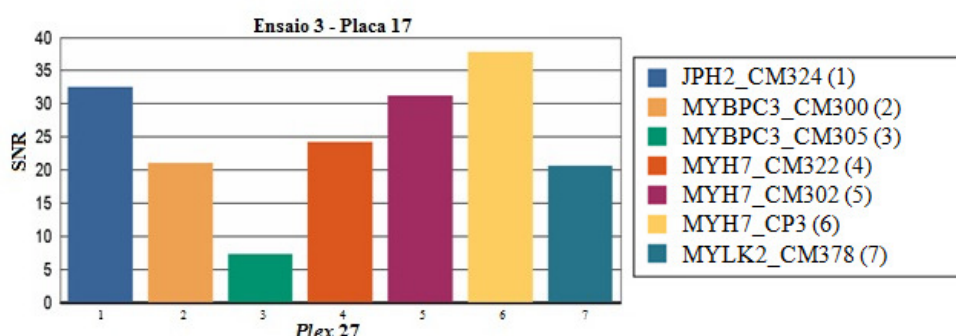


Figura 6.101 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 27 da Placa 17 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 7 mutações analisadas neste *plex 27*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 7 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 54), constatou-se que numa das mutações, a extensão foi insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. A mutação CM300 (posição nº 2 na Figura 6.101) no gene *MYBPC3* possui um genótipo agressivo (C), enquanto os restantes conjuntos de *primers* possuem genótipos moderados (B).

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 1 em 7 conjuntos de *primers* por otimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Há que ter em conta que esta realocação das mutações no Ensaio 3, não foi suficiente para uma completa optimização do

plex, face aos valores de SNR terem piorado e ao genótipo atribuído a cada uma das mutações não ser o ideal, correspondente ao esperado. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 28

O *plex* 28 é constituído por 7 conjuntos de *primers* alocados de outros *plexes* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.102A e 6.102B), verificou-se que apenas um conjunto de *primers* apresenta um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR. Foi recolocada 1 mutação anteriormente retirada.

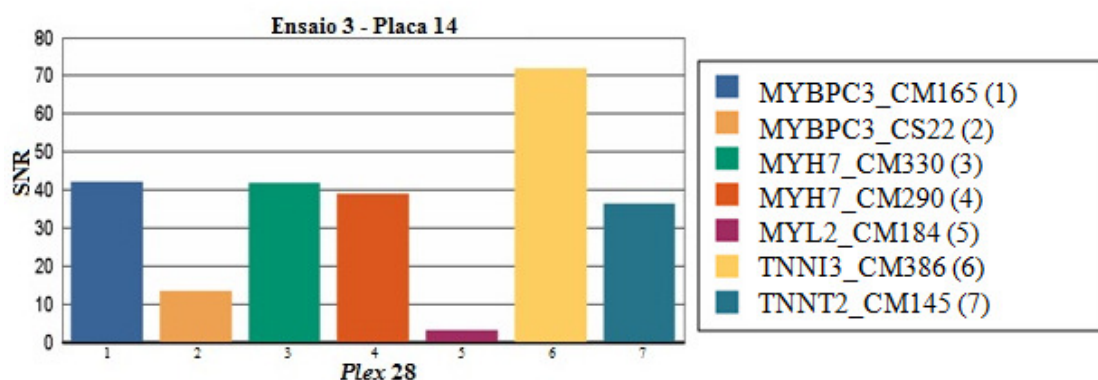


Figura 6.102 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex* 28 da Placa 14 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 7 mutações analisadas neste *plex* 28. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 7 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 56), constatou-se que apenas numa das mutações, a extensão foi insuficiente em todas as placas do ensaio, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido. A mutação CM429 (posição nº 5 na Figura 6.102) no gene *MYL2* apresenta um genótipo com baixa probabilidade (D), apesar de ter um valor de SNR elevado.

Ao avaliar a optimização realizada neste *plex*, concluiu-se que existem 1 em 7 conjuntos de *primers* por optimizar, tendo em conta os parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação. Há que ter em conta que esta realocação das mutações no Ensaio 3, não foi suficiente para uma completa optimização do *plex*, face aos valores de SNR terem piorado e ao genótipo atribuído a cada uma das mutações

não ser o ideal, correspondente ao esperado. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 29

O *plex 29* é constituído por 3 conjuntos de *primers* alocados de outros *plexes* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.103A e 6.103B), verificou-se que todos os conjuntos de *primers* apresentam valores de SNR elevados superiores a 4. Foram recolocadas 2 mutações anteriormente retiradas.

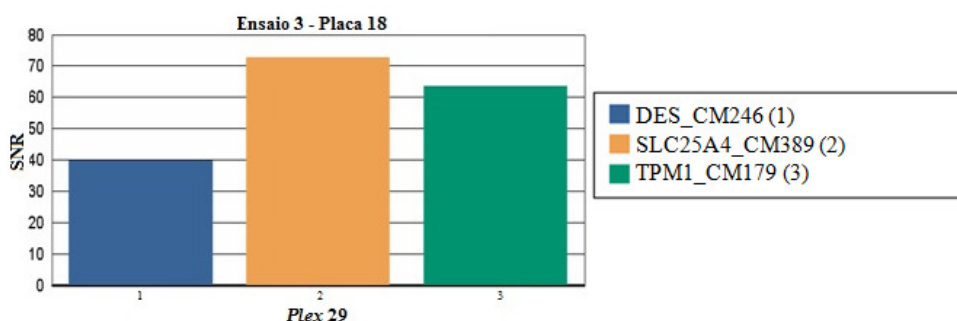


Figura 6.103 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex 29* da Placa 18 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 3 mutações analisadas neste *plex 29*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 3 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 58), constatou-se que em todas as mutações, a extensão foi elevada em todas as placas do ensaio. Contudo as mutações CM433 (posição nº 2 na Figura 6.110) no gene *SLC25A4* e CM434 (posição nº 3 na Figura 6.103) no gene *TPM1* possuem um genótipo com baixa probabilidade (D), enquanto a mutação CM433 (posição nº 1 na Figura 6.103) no gene *DES* não apresenta genótipo identificado (sem alelos – N). Ou seja, este *plex* apesar de possuir valores de SNR elevados, derivado a algum erro que possa ter ocorrido (como a pipetagem é realizada manualmente, pode ter ocorrido algum erro, e como a concentração dos *primers* é ao nível nanomolar, uma manipulação a esta escala influencia o ensaio), não apresenta os genótipos ideais. Há que ter em conta que esta realocação das mutações no Ensaio 3, não foi suficiente para uma completa optimização do *plex*, face aos valores de SNR terem piorado e ao genótipo atribuído a cada uma das mutações não ser o ideal, correspondente ao esperado. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex*

com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 30

O *plex 30* é constituído por 2 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.104A e 6.104B), verificou-se que ambos os conjuntos de *primers* apresentam valores de SNR elevados.

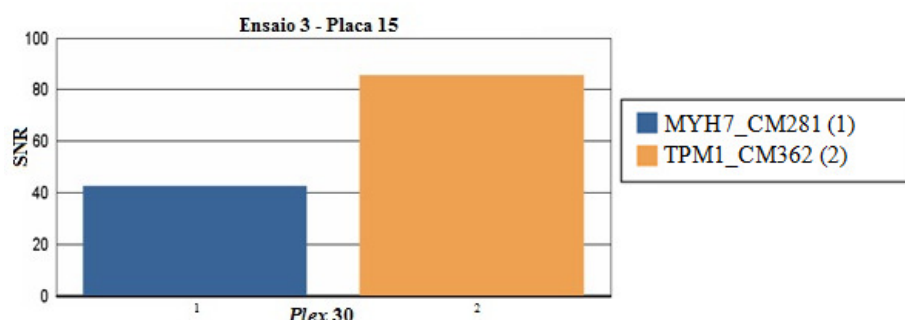


Figura 6.104 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex 30* da Placa 15 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 2 mutações analisadas neste *plex 30*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 2 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 60), constatou-se que nas 2 mutações, o valor de SNR foi elevado em todas as placas do ensaio, contudo ambas as mutações CM436 (posição nº 2 na Figura 6.104) no gene *TPM1* e CM435 (posição nº 1 na Figura 6.104) no gene *MYH7* apresentam um genótipo com baixa probabilidade (D). Ou seja, este *plex* apesar de possuir valores de SNR elevados, derivado a algum erro que possa ter ocorrido (como a pipetagem é realizada manualmente e a concentração dos *primers* é ao nível nanomolar, uma manipulação a esta escala influencia o ensaio), não apresenta os genótipos ideais. Há que ter em conta que esta realocação das mutações no Ensaio 3, não foi suficiente para uma completa optimização do *plex*, face aos valores de SNR terem piorado e ao genótipo atribuído a cada uma das mutações não ser o ideal, correspondente ao esperado. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 31

O *plex 31* é constituído por 2 conjuntos de *primers* e ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.105A e 6.105B), verificou-se que ambos os conjuntos de *primers* apresentam um valor de SNR elevado.

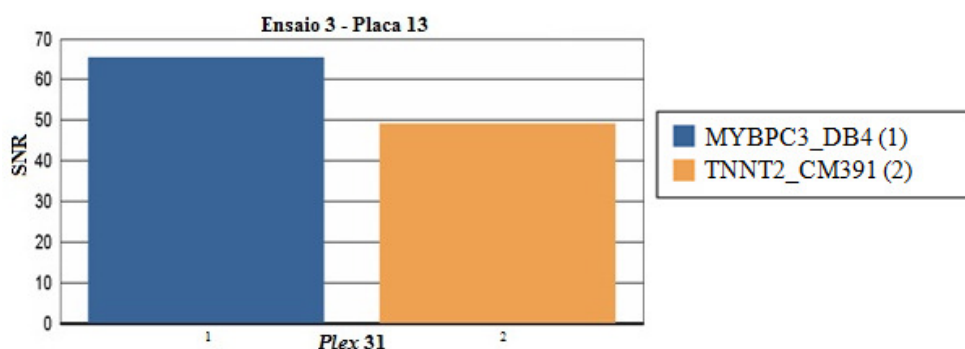


Figura 6.105 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o *plex 31* da Placa 13 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 2 mutações analisadas neste *plex 31*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 2 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 62), constatou-se que nas 2 mutações, a extensão foi elevada em todas as placas do ensaio. Apesar de ambas as mutações DB04 (posição nº 1 na Figura 6.105) no gene *MYBPC3* e CM437 (posição nº 2 na Figura 6.105) no gene *TNNT2* possuírem um valor de SNR elevado, não apresentam genótipo (sem alelos – N). Ou seja, este *plex* apesar de possuir valores de SNR elevados, derivado a algum erro que possa ter ocorrido (como a pipetagem é realizada manualmente, pode ter ocorrido algum erro e como as concentrações do *primers* é ao nível nanomolar, uma manipulação a esta escala influencia o ensaio), não apresenta os genótipos ideais. Há que ter em conta que esta realocação das mutações no Ensaio 3, não foi suficiente para uma completa optimização do *plex*, face aos valores de SNR terem piorado e ao genótipo atribuído a cada uma das mutações não ser o ideal, correspondente ao esperado. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 32

O *plex 32* é constituído por 16 conjuntos de *primers*, que foram realocados de outros *plexes*, com o objectivo de optimizar as suas reacções. Ao analisar os valores de SNR dos

conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.106A e 6.106B), constatou-se que alguns conjuntos de *primers* ainda apresentam um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*.

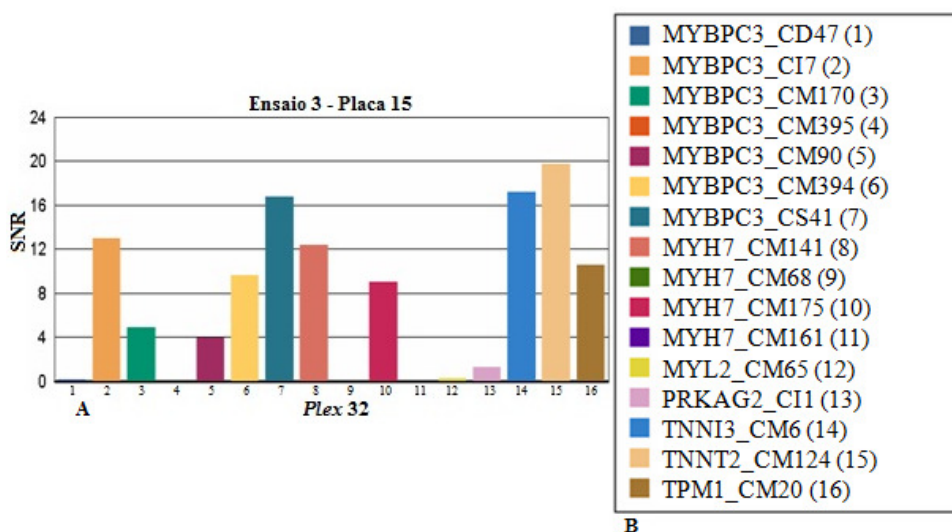


Figura 6.106 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 32 da Placa 15 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 16 mutações analisadas neste *plex* 32. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 16 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 63), constatou-se que apesar da otimização realizada pelo operador em alocar mutações que necessitavam de otimização de outros *plexes*, para este *plex*, constatou-se que a extensão contínua insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido para algumas mutações. Ao verificar os valores de SNR, de extensão e o genótipo atribuído a cada um dos 16 conjuntos de *primers* transferidos de outros *plexes*, constatou-se que em 9 conjuntos de *primers*, o valor de SNR melhorou significativamente, entre os valores 4 e 20, contudo os genótipos atribuídos a cada mutação não foram os ideais. Para as mutações CM394 (posição nº 6 na Figura 6.106, transferido do *plex* 1) e CS41 (posição nº 7 na Figura 6.106, transferido do *plex* 23) no gene *MYBPC3*; CM6 (posição nº 14 na Figura 6.106, transferido do *plex* 1) no gene *TNNI3*; CM20 (posição nº 16 na Figura 6.106, transferido do *plex* 1) no gene *TPM1*; CM124 (posição nº 15 na Figura 6.106, transferido do *plex* 5) no gene *TNNT2*; CM141 (posição nº 8 na Figura 6.106, transferido do *plex* 6) e CM175 (posição nº 10 na Figura 6.106, transferido do *plex* 7) no gene *MYH7*, o genótipo não foi identificado (sem alelos – N), enquanto para as mutações CM90 (posição nº 5 na Figura 6.106, transferido do *plex* 4) e CM170 (posição nº 3 na Figura

6.106, transferido do *plex* 7) no gene *MYBPC3*, o genótipo atribuído foi de baixa probabilidade (D).

Ao analisar os conjuntos de *primers* realocados dos outros *plexes* pelo operador aquando a optimização do Ensaio 2 para este *plex*, constatou-se que mesmo com a realocação dos conjuntos de *primers*, estes continuam a apresentar um valor de SNR, não superior a 4 para todas as mutações. Em relação ao genótipo atribuído a cada mutação, as mutações mutações CII (posição nº 13 na Figura 6.113, transferido do *plex*1) no gene *PRKAG2*; CM65 (posição nº 12 na Figura 6.106, transferido do *plex* 3) no gene *MYL2*; CM68 (posição nº 9 na Figura 6.106, transferido do *plex* 3) no gene *MYH7*; CD47 (posição nº 1 na Figura 6.106, transferido do *plex* 22) e CM395 (posição nº 4 na Figura 6.106, transferido do *plex* 22) no gene *MYBPC3* não possuem genótipo identificado (sem alelos – N), enquanto a mutação CM161 (posição nº 11 na Figura 6.106, transferido do *plex* 6) no gene *MYH7* apesar de possuir um genótipo moderado (B), possui um valor de SNR nulo. Ou seja, este *plex* apesar de possuir valores de SNR elevados para algumas mutações, derivado a algum erro que possa ter ocorrido (como a pipetagem é realizada manualmente, pode ter ocorrido algum erro e como a concentração do *primers* é ao nível nanomolar, uma manipulação nesta escala influencia o ensaio), não apresenta os genótipos ideais. Há que ter em conta que esta realocação das mutações no Ensaio 3, não foi suficiente para uma completa optimização do *plex*, face aos valores de SNR terem piorado e ao genótipo atribuído a cada uma das mutações não ser o ideal, correspondente ao esperado. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 33

O *plex* 33 é constituído por 9 conjuntos de *primers*, realocados de outros *plexes*, de modo a optimizar as suas reacções. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.107A e 6.107B), constatou-se que ainda existem alguns conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*.

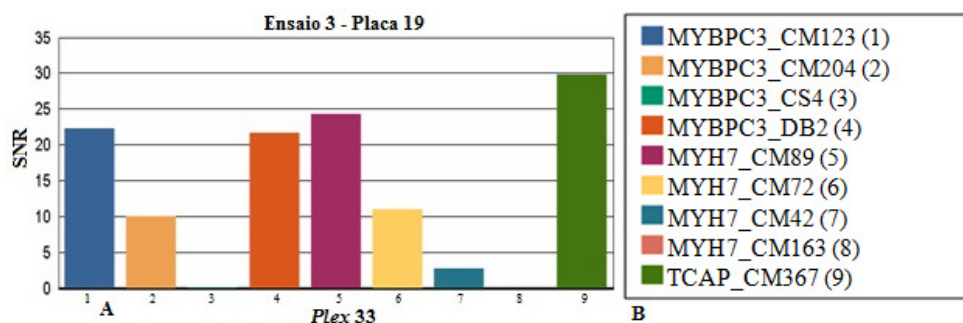


Figura 6.107 – Figura A e B - Primer Adjustment Report para o plex 33 da Placa 19 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 9 mutações analisadas neste *plex33*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 9 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 63), constatou-se que apesar da otimização realizada pelo operador em alocar mutações que necessitavam de otimização de outros *plexes*, para este *plex*, constatou-se que a extensão contínua insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido para algumas mutações. Ao verificar o valor e SNR, de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação, constatou-se que em 6 conjuntos de *primers*, o valor de SNR melhorou significativamente, para valores entre os 4 e 25. Contudo a mutação CM89 (posição nº 5 na Figura 6.107, transferido do *plex* 4) no gene *MYH7* possui um genótipo atribuído de baixa probabilidade (D), enquanto as restantes mutações CM72 (posição nº 6 na Figura 6.107, transferido do *plex* 3) no gene *MYH7*; CM123 (posição nº 1 na Figura 6.107, transferido do *plex* 5), CM204 (posição nº 2 na Figura 6. 107, transferido do *plex* 8) e DB2 (posição nº 4 na Figura 6.107, transferido do *plex* 10) no gene *MYBPC3* e CM367 (posição nº 9 na Figura 6.107, transferido do *plex* 17) no gene *TCAP* não apresentam genótipo atribuído (sem alelos – N). As restantes 3 mutações CM42 (posição nº 7 na Figura 6. 107, transferido do *plex* 2) no gene *MYBPC3* e CM163 (posição nº 8 na Figura 6.107, transferido do *plex* 6) no gene *MYH7* não possuem genótipo identificado (sem alelos – N), enquanto a mutação CS4 (posição nº 3 na Figura 6.107, transferido do *plex* 1) no gene *MYBPC3* possui um genótipo moderado (B), com um valor de SNR de 3, 19 e 6, respectivamente. Apesar destas mutações apresentarem um valor de SNR elevado, ainda necessitam de uma otimização futura, dado que os genótipos atribuídos não serem os ideais. Isto pode ter ocorrido devido a algum erro no processo de amplificação, ocorrendo algum erro de pipetagem e ao alterar a concentração do *primer* (ao nível do nanomolar), uma manipulação a esta escala influencia o ensaio. Por outro lado, mesmo com a realocação dos conjuntos de *primers* em outros *plexes*, os restantes 3 conjuntos de *primers*, continuam a

apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR. Até se pode pensar que estas alterações foram bem sucedidas, dado que os valores de SNR são elevados, contudo há que ter em conta que os genótipos não são os ideais. Ou seja, este *plex* apesar de possuir valores de SNR elevados, derivado a algum erro que possa ter ocorrido (como a pipetagem é realizada manualmente, pode ter ocorrido algum erro e como a concentração do *primer* é ao nível nanomolar uma manipulação a esta escala influencia o ensaio), não apresenta os genótipos ideais. Há que ter em conta que esta realocação das mutações no Ensaio 3, não foi suficiente para uma completa optimização do *plex*, face aos valores de SNR terem piorado e ao genótipo atribuído a cada uma das mutações não ser o ideal, correspondente ao esperado. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 34

O *plex 34* é constituído por 8 conjuntos de *primers*, realocados de outros *plexes*, de modo a optimizar as reacções. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de *primers* das placas do Ensaio 3 (Figura 6.108A e 6.108B), constatou-se que existem alguns conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR no *plex*.

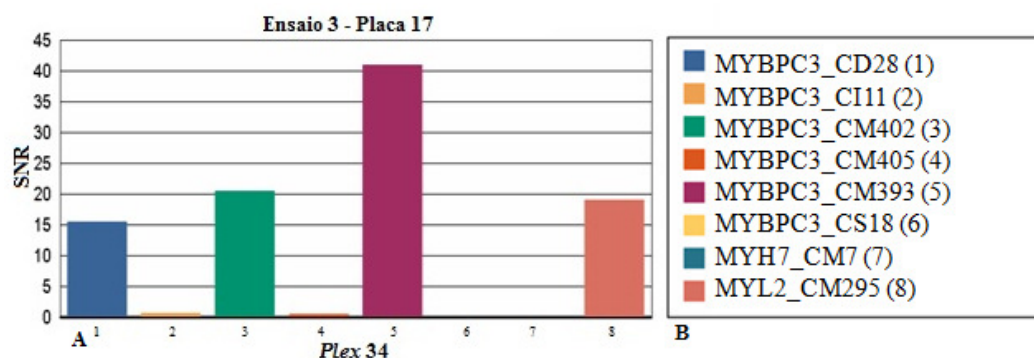


Figura 6.108 – Figura A - Primer Adjustment Report para o *plex 34* da Placa 17 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 8 mutações analisadas neste *plex 34*. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 8 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 63), constatou-se que apesar da optimização realizada pelo operador em alocar mutações que necessitavam de optimização de outros *plexes*, para este *plex*, constatou-se que a extensão contínua insuficiente, em sintonia com a

baixa significância estatística do genótipo obtido para algumas mutações. Ao verificar o valor e SNR, de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação, constatou-se que em 4 conjuntos de *primers*, apesar dos valores de SNR melhorarem significativamente, rondando os valores entre 20 e 40, estas mutações continuam a apresentar um genótipo que não é o ideal. A mutação CD28 (posição nº 1 na Figura 6.108, transferido do *plex* 9) no gene *MYBPC3* não possui genótipo identificado (sem alelos – N), enquanto as restantes mutações CM393 (posição nº 5 na Figura 6.108, transferido do *plex* 22) e CM402 (posição nº 3 na Figura 6.108, transferido do *plex* 23) no gene *MYBPC3* e CM295 (posição nº 8 na Figura 6.108, transferido do *plex* 12) no gene *MYL2* possuem um genótipo de baixa probabilidade (D). Apesar das restantes 4 mutações CM7 (posição nº 7 na Figura 6.108, transferido do *plex* 1) no gene *MYH7* e CM405 (posição nº 4 na Figura 6.108, transferido do *plex* 24) no gene *MYBPC3* possuírem um genótipo com baixa probabilidade (D) e as mutações CS18 (posição nº 6 na Figura 6.108, transferido do *plex* 5) e CII1 (posição nº 2 na Figura 6.108, transferido do *plex* 23) o gene *MYBPC3* não apresentarem genótipo (sem alelos – N), o valor de SNR das 4 mutações é nulo. Até se pode pensar que estas alterações foram bem sucedidas, dado que os valores de SNR são elevados nas 4 primeiras mutações, contudo há que ter em conta que os genótipos não são os ideais. Ou seja, este *plex* apesar de possuir valores de SNR elevados, derivado a algum erro que possa ter ocorrido (como a pipetagem é realizada manualmente, pode ter ocorrido algum erro e como a concentração dos *primers* é ao nível nanomolar, uma manipulação esta escala influencia o ensaio), não apresenta os genótipos ideais. Por outro lado, mesmo com a realocação dos conjuntos de *primers* em outros *plexes*, os restantes 4 conjuntos de *primers*, continuam a apresentar um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR. Há que ter em conta que esta realocação das mutações no Ensaio 3, não foi suficiente para uma completa optimização do *plex*, face aos valores de SNR terem piorado e ao genótipo atribuído a cada uma das mutações não ser o ideal, correspondente ao esperado. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Plex 35

O *plex* 35 é constituído por 4 conjuntos de *primers*, realocados de outros *plexes*, com o objectivo de optimizar as suas reacções. Ao analisar os valores de SNR dos conjuntos de

primers das placas do Ensaio 3 (Figura 6.116A e 6.116B), verificou-se que existe apenas um conjunto de *primers* com valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR do *plex*.

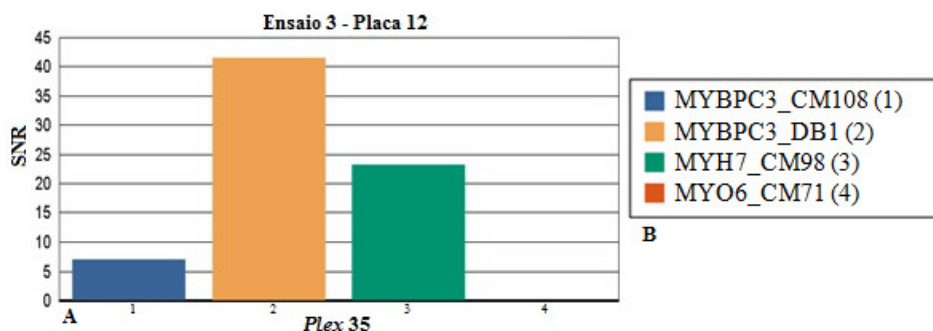


Figura 6.109 – Figura A - Primer Adjustment Report para o plex 35 da Placa 12 do Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 4 mutações analisadas neste *plex* 35. Na Figura B encontra-se a legenda da figura A, identificando-se os genes correspondentes a cada barra da figura A.

Ao analisar-se os resultados do *Plate Result Report* e do *Call Cluster Plot* para as 4 mutações nas placas do Ensaio 3 (Anexo 63), constatou-se que apesar da otimização realizada pelo operador em alocar mutações que necessitavam de otimização de outros *plexes*, para este *plex*, constatou-se que a extensão contínua insuficiente, em sintonia com a baixa significância estatística do genótipo obtido para uma mutação. Ao verificar o valor e SNR, de extensão e o genótipo atribuído a cada mutação, dos 4 conjuntos de *primers* transferidos de outros *plexes*, constatou-se que em 3 conjuntos de *primers*, o valor de SNR melhorou significativamente, rodando os valores entre 10 e 40, contudo o genótipo atribuído a cada mutação não foi o ideal. As mutações CM98 (posição nº 3 na Figura 6.109, transferido do *plex* 4) no gene *MYH7* e DB1 (posição nº 2 na Figura 6.109, transferido do *plex* 9) no gene *MYBPC3* não apresentam genótipo identificado (sem alelos – N), enquanto a mutação CM108 (posição nº 1 na Figura 6.109, transferido do *plex* 5) no gene *MYBPC3* apresenta um genótipo moderado (B), necessitando de otimização. Por outro lado, a mutação CM71 (posição nº 4 na Figura 6.109, transferido do *plex* 24) no gene *MYO6* continua a apresentar um valor de SNR nulo, sem atribuição de genótipo (sem alelos – N). Até se pode pensar que estas alterações foram bem sucedidas, dado que os valores de SNR são elevados, contudo há que ter em conta que os genótipos não foram os ideais. Ou seja, este *plex* apesar de possuir valores de SNR elevados, derivado a algum erro que possa ter ocorrido (como a pipetagem é realizada manualmente, pode ter ocorrido algum erro e como a concentração dos *primers* é ao nível nanomolar, uma manipulação nesta escala influencia o ensaio), não apresenta os genótipos ideais. Há que ter em conta que esta realocação das mutações no Ensaio 3, não foi suficiente

para uma completa optimização do *plex*, face aos valores de SNR terem piorado e ao genótipo atribuído a cada uma das mutações não ser o ideal, correspondente ao esperado. Para uma estratégia de optimização futura, é necessário considerar outros factores, para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*. Neste caso, será necessário ajustar a concentração destes de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Ao avaliar os 35 *plexes* que constituem o Ensaio 3, constatou-se que após a realocação de 37 conjuntos de *primers*, pelo operador aquando a optimização do Ensaio 2, estes foram reagrupados em 4 novos *plexes* (*plexes* 32, 33, 34 e 35), com o objectivo de optimizar um maior número de mutações possíveis.

Ao avaliar cada um dos *plexes*, quanto aos três parâmetros base, o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada uma das mutações, constatou-se que ao retirar determinados conjuntos de *primers* por *plex* transferindo-os para outros *plexes*, o número de conjuntos de *primers* por optimizar diminuiu. Nos *plexes* 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 22, 24, 26, 27 e 28 obteve-se uma melhoria significativa, dado que passou a existir um menor número de conjuntos de *primers* em relação ao número total de conjuntos de *primers* em cada *plex*, com um valor de SNR e de extensão reduzidos ou mesmo nulos e um genótipo atribuído a cada mutação inadequado. Tendo em conta o número total de conjuntos de *primers* dos *plexes* 3, 11, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 25, verificou-se que existe um elevado número de mutações por optimizar, sendo estes os *plexes* a necessitar de uma optimização imediata por parte do operador. Em relação aos *plexes* 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35, constatou-se que apesar de todos os conjuntos de *primers* apresentarem um valor de SNR e de extensão elevados, possuem um genótipo atribuído a cada uma das mutações inadequado, para os considerar optimizados.

6. Conclusão e Perspectivas Futuras

A MH caracteriza-se por ser a doença cardíaca genética mais frequente, ocorrendo em 1:500 indivíduos, com um padrão de transmissão autossómico dominante e com mutações associadas a genes sarcoméricos e a não sarcoméricos. O diagnóstico clínico é realizado através de análises bioquímicas, ECG e EEG e o diagnóstico molecular é efectuado recorrendo maioritariamente à SA dos 5 principais genes sarcoméricos que controlam o mecanismo de contração cardíaca, *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* e *MYL2*.

No entanto, esta metodologia é considerada bastante dispendiosa e demorada, não incluindo na análise muitos dos genes a ela associados, tendo como consequência, não permitir identificar mutações em cerca de 1/3 dos pacientes. A relação tempo de execução *versus* custo é também um argumento que desfavorece a sua aplicação. Torna-se assim importante a implementação de novas metodologias para um diagnóstico da MH adequado e eficaz.

A Genotipagem por *iPLEX MassARRAY* permite uma detecção rápida, eficaz e menos dispendiosa de um elevado número de mutações em inúmeros genes num único ensaio, em comparação com a SA. Este método baseia-se na utilização de um *microchip* (Sequenom[®]), onde se colocam as regiões de interesse a analisar, neste caso as 541 mutações nos 33 genes associados à MH, permitindo uma análise simultânea de pelo menos 10 amostras por placa.

Com o objectivo de otimizar e validar a aplicação da tecnologia de *iPLEX MassARRAY*, ao diagnóstico genético de 541 mutações associadas à MH, foram analisados, no decorrer desta dissertação, em 3 ensaios independentes, 3 parâmetros que permitem verificar se uma dada mutação está ou não a ser identificada correctamente num dado *plex*: o valor de SNR relativo ao *primer* de extensão, o valor de extensão fornecido pelo *Call Cluster Plot* e o respectivo genótipo atribuído. De modo a otimizar as reacções de PCR *multiplex* nos vários ensaios, foi necessária uma análise bioinformática extensa, com base no *Primer Adjustment Report*, o *Plate Result Report*, *Autocluster* e o *Call Cluster Plot*. A ferramenta do *Autocluster* aumenta a sensibilidade de detecção do sinal gerado pelas reacções de extensão dos *primers*, enquanto o *Cluster Call* origina os gráficos demonstrativos da organização por *clusters*, relativamente aos genótipos para cada uma das mutações em análise, dando a informação acerca do valor de extensão de cada mutação. Seguidamente foi utilizada a ferramenta do *Autocluster*, de modo a aumentar a sensibilidade dos resultados. Por fim, para

avaliar os valores de SNR e o genótipo atribuído a cada uma das mutações, foram utilizados os relatórios do *Primer Adjustment Report*, que permitem a análise dos valores de SNR para cada conjunto de *primers* e do *Plate Result Report* que fornece a descrição pormenorizada dos resultados de genotipagem, tendo em conta uma classificação baseada na significância estatística.

No Ensaio 1, as 541 mutações foram distribuídas por 21 *plexes* em 2 placas (Placa 1 e 2) e ao analisar os seus resultados, constatou-se que 285 (53%) das 541 mutações apresentavam um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, associado com um valor de extensão reduzido e um genótipo inadequado atribuído a cada mutação, maioritariamente agressivo (C), de baixa probabilidade (D) ou mesmo sem identificação de genótipo (N). Aquando a optimização do Ensaio 1, o operador optou por remover 72 ao total das 541 mutações analisadas, tendo por base unicamente o valor de extensão de cada uma das mutações, deixando por retirar de cada um dos *plexes*, um determinado número de conjuntos de *primers* que também necessitavam de optimização.

Das 72 mutações removidas a cada *plex*, 6 foram removidas incorrectamente, dado que o operador só considerou o valor de extensão, deixando por analisar o valor de SNR destas e o genótipo atribuído a cada mutação. Em relação às restantes 66 mutações, todas foram correctamente removidas do *plex* de origem (Tabela 6.3). Alguns dos conjuntos de *primers* removidos de cada um dos 21 *plexes*, constituíram os *plexes* 22 a 31.

Ao analisar os 31 *plexes* que constituem o Ensaio 2, distribuídos por 5 placas (Placa 3, 5, 6, 9 e 10), tendo em conta o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada uma das mutações, constatou-se que ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, ocorreu uma melhoria significativa na maioria dos 31 *plexes*, em que apenas 86 (16%) das 541 mutações apresentaram um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR, associado com um valor de extensão reduzido e um genótipo inadequado atribuído a cada mutação, maioritariamente agressivo (C), de baixa probabilidade (D) ou mesmo sem identificação de genótipo (N).

Ao reduzir o número de conjuntos de *primers* por *plex*, os *plexes* 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 17, 18, 19 e 20, apresentaram uma melhoria significativa, em relação ao número de mutações por optimizar, sendo necessário apenas a optimização de um número reduzido de mutações por *plex*. Apesar de também ter ocorrido uma redução do número de conjuntos de *primers* nos *plexes* 3, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15 e 16, constatou-se que continua a existir um elevado número de conjuntos de *primers* com um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo de SNR,

associado com um valor de extensão reduzido e um genótipo inadequado atribuído a cada mutação. Para estes *plexes*, o ideal é que todas as suas reacções sejam optimizadas.

Em relação às mutações alocadas nos *plexes* 22 a 31, verificou-se que ocorreu uma melhoria significativa no valor de SNR, no valor de extensão e no genótipo atribuído a cada mutação, dado que estas foram distribuídas em *plexes* com um menor número de mutações, com o objectivo de evitar a combinação de *primers* e de produtos de extensão que possam resultar na formação de dímeros de *primers* e numa hibridação não específica dos oligonucleótidos Sequenom®)

Aquando da optimização do Ensaio 2, o operador recolocou todas as 72 mutações anteriormente retiradas nos *plexes* de origem e desta vez, com base no valor de SNR, no valor de extensão e no genótipo atribuído a cada mutação, optou por retirar apenas 37 conjuntos de *primers*, reagrupando-os em 4 novos *plexes* (*plexes* 32, 33, 34 e 35), perfazendo um total de 35 *plexes* para o próximo ensaio.

Ao analisar as 541 mutações nos 35 *plexes* do Ensaio 3, testadas em 9 placas (Placa 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19) tendo em conta o valor de SNR, o valor de extensão e o genótipo atribuído a cada uma das mutações, constatou-se que 157 (29%) das 541 mutações testadas ainda apresentam um valor de SNR inferior a 45% do valor máximo do SNR, associados com um genótipo inadequado, maioritariamente genótipos agressivos (C), de baixa probabilidade (D) e mesmo mutações sem genótipo identificado (sem alelos – N), necessitando de optimização. Por outro lado existem 37 conjuntos de *primers* a apresentar um valor de SNR elevado nos *plexes* 29, 30, 31, 31, 33, 34 e 35; contudo, apresentam igualmente um genótipo inadequado, em que a maioria dos genótipos atribuídos foram classificados em agressivos (C), de baixa probabilidade (D) ou mesmo em alguns casos, não foram identificados nenhum genótipo (sem alelos – N). É de considerar que provavelmente ocorreu um erro que poderá estar na origem da pipetagem, que é realizada manualmente e como a concentração dos *primers* é ao nível nanomolar e a manipulação a esta escala, influencia o ensaio e os genótipos atribuídos a cada mutação. Há que ter em conta, que a realocação das mutações do Ensaio 2 para o Ensaio 3, também não foi suficiente para que ocorresse a optimização completa das 541 mutações, uma vez que muitas mutações quando realocadas noutros *plexes*, o seu valor de SNR piorou, associadas a um genótipo que não foi o ideal, correspondente ao esperado inicialmente. Nestes casos, pensa-se que o melhor será ajustar a concentração dos conjuntos de *primers* de acordo com a sua massa ou mesmo redesenhá-los.

Para uma estratégia de optimização futura, é necessário ter em conta, sendo recomendável, que para além do facto de as reacções serem realizadas em *multiplex* com um maior ou menor número de conjuntos de *primers*, será também necessário ajustar a concentração destes, de acordo com a sua massa ou redesenhá-los.

Outra medida possível a tomar, será recorrer à pipetagem automática, quer dos conjuntos de *primers*, quer das amostras de DNA, com *robots* especializados, de modo a evitar que as suas concentrações, quer dos *primers*, quer do DNA seja afectada.

Como perspectivas futuras, pretende-se a optimização completa de todas as condições de reacção inerentes ao *iPLEX MassARRAY* para que de algum modo esta tecnologia possa vir a contribuir para um diagnóstico mais acessível, menos dispendioso, mais rápido, podendo tornar-se uma das tecnologias mais utilizadas no diagnóstico desta doença genética.

7. Bibliografia

- Ahmad, F., Arad, M., Musi, N. *et al...* (2005). *Increased α_2 Subunit-Associated AMPK Activity and PRKAG2 Cardiomyopathy*. *Circulation*, 112, 3140-3148
- Ahmad, F., Seidman, J.G. e Seidman, C. E.. (2005). *The Genetic Basis for Cardiac Remodeling*. *Annual Rev. Genomics Human Genetics*, 6, 185-216
- Alcalai, R., Seidman, J. G. e Seidman, C. E. (2008). *Genetic Basis of Hypertrophic Cardiomyopathy: From Bench to the Clinics*. *Journal of Cardiovascular electrophysiology*, 19, 104-110
- Allegue, C., Gil, R., Sanchez-Diz, S. *et al..* (2010). *A new approach to long QT syndrome mutation detection by Sequenom MassARRAYs system*. *Electrophoresis*, 31, 1648-1655
- Andersen, P. S., Havndrup, O., Hougs, L. *et al..* (2008). *Diagnostic Yield, Interpretation, and Clinical Utility of Mutation Screening of Sarcomere Encoding Genes in Danish Hypertrophic Cardiomyopathy Patients and Relatives*. *Human Mutation*, 30, 363-370
- Arad, M., Maron, B. J., Gorham, J. M. *et al..* (2005). *Glycogen Storage Diseases Presenting as Hypertrophic Cardiomyopathy*. *The new england journal of medicine*, 352, 362-372.
- Arad, M., Seidman, J. G. e Seidman, C.. (2002). *Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy*. *Human Molecular Genetics*, 11, 2499-2506
- Arimura, T., Bos, J. M., Sato, A. *et al..* (2009). *Cardiac Ankyrin Repeat Protein Gene (ANKRD1) Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy*. *Journal of the American College of Cardiology*, 54, 334-342
- Bagnall, R. D., Ingles, J. e Semsarian, C.. (2011). *Molecular Diagnostics of Cardiomyopathies: The Future is Here*. *Circ Cardiovasc Genet*, 4, 103-104
- Bailey, K.. (1948). *Tropomyosin: a New Asymmetric Protein Component of the Muscle Fibril*. *Biochem Journal*, 43, 271-279
- Bang, M. L., Centner, T., Fornoff, F. *et al..* (2001). *The Complete Gene Sequence of Titin, Expression of an Unusual 700-kDa Titin Isoform, and Its Interaction With Obscurin Identify a Novel Z-Line to I-Band Isoform, and Its Interaction With Obscurin Identify a Novel Z-Line to I-Band*. *Circulation Research*, 89, 1065-1072
- Bashyam, M. D., Savithri, G. R., Kumar, M. S. *et al..* (2003). *Molecular genetics of familial hypertrophic cardiomyopathy*. *J. Hum Genet*, 48, 55-64

- Basavarajaiah, S., Shah, A., Sharma, S.. (2007). *Sudden cardiac death in young athletes*. Heart, 93, 287-289
- Bos, J. M., Towbin, J. A., Ackerman, M. J. *et al.*. (2009). *Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Implications of Genetic Testing for Hypertrophic Cardiomyopathy*. Journal of the American College of Cardiology, 54, 201-209
- Cardim, N., Perro, A., Santos, S. *et al.*. (2005). *Miocardiopatia Hipertrófica em População Portuguesa: Mutações na Proteína C que liga à Miosina*. Revista Portuguesa de Cardiologia, 24, 1463-1476
- Carniel, E., Taylor, M. R. G., Sinagra, G. *et al.*. (2005). *α -Myosin Heavy Chain A Sarcomeric Gene Associated With Dilated and Hypertrophic Phenotypes of Cardiomyopathy*. Circulation, 112, 54-59
- Christiaans, I., Nannenberg, E.A., Dooijes, D. *et al.*. (2010). *Founder mutations in hypertrophic cardiomyopathy patients in the Netherlands*. Netherlands Heart Journal, 18, 248-254
- Cirino, A. L. e Ho, C., (2009). *Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Overview*. Gene Reviews
- DeGoma, E. M., Vagelos, R. H., Fowler, M. B. *et al.*. (2006). *Emerging Therapies for the Management of Decompensated Heart Failure: From Bench to Bedside*. Journal American College Cardiology, 48, 2397-2409
- Elliott, P. e McKenna, W. J.. (2004). *Hypertrophic Cardiomyopathy*. The Lancet, 363, 1881-1891
- Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E. *et al.*. (2008). *Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases*. European Heart Journal, 29, 270-276
- Fanin, M., Nascimbeni, A. C., Fulizio, L. e tal. (2006). *Generalized Lysosome-Associated Membrane Protein-2 Defect Explains Multisystem Clinical Involvement and Allows Leukocyte Diagnostic*. American Journal of Pathology, 168, 1309-1320
- Fatkin, D e Graham, R. M.. (2002). *Molecular Mechanisms of Inherited Cardiomyopathies*. American Physiological Society, 82, 945-980
- Faulkner, G., Lanfranchi, G. e Valle, G.. (2001). *Telethonin and Other New Proteins of the Z-Disc of Skeletal Muscle*. IUBMB Life, 51, 275-282
- Flashman, E., Redwood, C., Moolman-Smook, J. *et al.*. (2004). *Cardiac Myosin Binding Protein C: Its Role in Physiology and Disease*. Circulation Research, 94, 1279-1289

- Gabriel, S., Ziaugra, L. e Tabbaa, D.. (2009). *SNP Genotyping Using the Sequenom MassARRAY iPLEXPlatform*. Wiley Interscience, Unit 2.12.1-2.12.18
- Geier, C., Gehmlich, K., Ehler, E. *et al...* (2008). *Beyond the sarcomere: CSRP3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy*. Human Molecular Genetics, 17, 2753-2765
- Geier, C., Perrot, A., Özcelik, C. *et al...* (2003). *Mutations in the Human Muscle LIM Protein Gene in Families with Hypertrophic Cardiomyopathy*. Circulation, 107, 1390-1395
- Girolami, F., Ho, C. Y., Semsarian, C. *et al..* (2010) *Clinical Features and Outcome of Hypertrophic Cardiomyopathy Associated with Triple Sarcomere Protein Gene Mutations*. Journal of the American College of Cardiology, 55, 1444-1453
- Gollob, M. H., Seger, J. J., Gollob, T. N. *et al..* (2001). *Novel PRKAG2 Mutation Responsible for the Genetic Syndrome of Ventricular Preexcitation and Conduction System Disease with Childhood Onset and Absence of Cardiac Hypertrophy*. Journal of the American Heart Association, 104, 3030-3033
- Gomes, A. V., Potter, J. D. e Szczesna-Cordary, D.. (2002). *The Role of Troponins in Muscle Contraction*. IUBMB Life, 54, 323-333
- Gordon, A. M., Homsher, E. e Regnier, M.. (2000). *Regulation of Contraction in Striated Muscle*. Physiological Reviews, 80, 853-924
- Hamdani, N., Kooij, V., Van Dijk, S. *et al..* (2008). *Sarcomeric dysfunction in heart failure*. Cardiovascular Research, 77, 649-658
- Harrigan, J. C., Appelbaum, E., Maron, B. J. *et al..* (2008). *Significance of Papillary Abnormalities Identified by Cardiovascular Magnetic Resonance in Hypertrophic Cardiomyopathy*. J. Cardiol, 101, 668-673
- Hayashi, T., Arimura, T., Itoh-Satoh M. *et al...* (2004). *TCAP Gene Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy and Dilated Cardiomyopathy*. Journal of the American College of Cardiology, 44, 2192-2201
- Hein, S. e Schaper, J.. (2002). *Weakness of a giant: mutations of the sarcomeric protein titin*. Trends in Molecular Medicine, 8, 311-313
- Hershberguer, R. E., Cowan, Morales, A. *et al..* (2009). *Progress with genetic cardiomyopathies: Screening, counseling, and testing in dilated, hypertrophic and arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy*. Cir Heart Fail, 2(3), 253-261

- Ho, C. Y..(2010). *Hypertrophic Cardiomyopathy*. Heart Failure Clinique, 6, 141-159
- Hughes, S. E. e McKenna, W. J.. (2005). *New Insights into the Pathology of Inherited Cardiomyopathy*. Heart BMJ Group, 91, 257-264
- Ingles, J., Doolan A., Chiu, C. *et al..* (2005). *Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling*. Journal Medicine Genetic, 42, 1-6
- Jarcho, J. A., McKenna, W., Peter Pare, J. A., *et al..* (1989). *Mapping a Gene for Familial Hypertrophic Cardiomyopathy to Chromosome 14q1*. New England J Med, 321, 1372-1378
- Klabunde, R. E.. (2004). Cellular Structure and Function in Cardiovascular Physiology Concepts. 6ª edição , 41-44, Estados Unidos da América, Lippincott Williams & Wilkins
- Konno, T., Chang, S., Seidman, J. G. *et al..* (2011). *Genetics of Hypertrophic Cardiomyopathy*. Curr Opin Cardiology, Doi: 10.1097/HCO.0b013e3283375698
- Lammey, M. L., Baskin, G. B., Gigliotti, A. P. *et al..* (2008). *Interstitial Myocardial Fibrosis in a Captive Chimpanzee (Pan troglodytes) Population*. Comparative Medicine, 58, 389-394
- Landstrom, A. P., Parvatiyar, M. S., Pinto, J. R. *et al..* (2008). *Molecular and functional characterization of novel hypertrophic cardiomyopathy susceptibility mutations in TNNC1-encoded troponin C*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 45, 281–288
- Magno, P., Freitas, A. e Gil, V. M.. (2007). *Não compactação do ventrículo Esquerdo: Revisão da Literatura a Propósito de um Caso Clínico*. Revista Portuguesa de Cardiologia, 26 (12), 1381-1391
- Marian, A. J.. (2010). *Hypertrophic cardiomyopathy: from genetics to treatment*. European Journal of Clinical Investigation, 40, 360-369
- Marian, A. J.. (2008). *Genetic determinants of cardiac hypertrophic*. Curr Opin Cardiology, 23, 199-205
- Marian, A. J.. (2002). *Modifier genes for hypertrophic cardiomyopathy*. Curr Opin Cardiology, 17, 242-252
- Maron, B. J., Towbin, J. A., Thiene, G. *et al..* (2006). *Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies: An American Heart Association Scientific Statement From the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and*

- Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention*. Circulation Journal of the American Heart Association, 113, 1807-1816
- Maron, B. J. e Pelliccia, A.. (2006). *The Heart of Trained Athletes: cardiac Remodelling and the Risks of Sports, Including Sudden Death*. Circulation Journal of the American Heart Association, 114, 1633-1644
 - Millat, G., Chanavat, V., Créhalet, H. *et al.*. (2010). *Development of a high resolution melting method for the detection of genetic variations in hypertrophic cardiomyopathy*. Clinica Chimica Acta, 411, 1983-1991
 - Miller, T., Szczesna, D., Housmans, P. R. *et al.*. (2001). *Abnormal Contractile Function in Transgenic Mice Expressing a Familial Hypertrophic Cardiomyopathy-linked Troponin T (I79N) Mutation*. The Journal of Biological Chemistry, 276, 3743-3755
 - Saftig, P.. (2005). *Lysosomal Membrane Proteins in Lysosomes*. 1ª edição, pp 37-40, Alemanha: Landes Biosciense & Springer
 - Monserrat, L., Hermida-Prieto, M., Fernandez, X. *et al.*. (2007). *Mutation in the alpha-cardiac actin gene associated with apical hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction, and septal defects*. European Heart Journal, 28, 1953-1961
 - Morimoto, S.. (2008). *Sarcomeric proteins and inherited Cardiomyopathies*. Cardiovascular Research, 77, 659-666
 - Morita H., Nagai, R., Seidman, J. G. *et al.*. (2010). *Sarcomere Gene Mutations in Hypertrophic and Heart Failure*. Journal of Cardiovascular Trans. Res. 3, 297-303
 - Nelson, D. L e Cox, M. M.. (2005). *Protein Function in Lehninger, Principles of Biochemistry*. 4ª edição, 182-186, Estados Unidos da América: W. H. Freeman and Company
 - Oeth, P., Beaulieu, M., Park, C. *et al.*. (2005). *iPLEXTM Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY[®] System Through Single Base Primer Extension with Mass-Modified Terminators*. Sequenom[®] Application Note, 8876-006
 - Olivotto, I., Cecchi, F., Poggesi, C. *et al.*. (2009). *Developmental origins of hypertrophic cardiomyopathy phenotypes: a unifying hypothesis*. Nature reviews cardiology, 6, 317-321
 - Olivotto, I., Girolami, F., Nistri, S. *et al.*. (2009). *The Many faces of Hypertrophic Cardiomyopathy: From Development Biology to Clinical Practice*. Journal of Cardiovascular Translational Research, 2, 349-367

- Person, V., Kostin, S., Suzuki, K. *et al.*. (2000). *Antisense oligonucleotide experiments elucidate the essential role of titin in sarcomerogenesis in adult rat cardiomyocytes in long-term culture*. Journal of Cell Science, 113, 3851-3859
- Piva e Matos, B., Torres, M. A. R e Freitas, V. C.. (2008). *Diagnostic Evaluation of Hypertrophic Cardiomyopathy in its Clinical and Preclinical Phases*. Arquivo Brasileiro de Cardiologia, 91, 51-57
- Prinz, C., Farr, M. Hering, D. *et al.*. (2011). *The Diagnosis and Treatment of Hypertrophic Cardiomyopathy*. Deutsches Ärzteblatt International, 108, 209–215
- Ragoussis, J., Elvidge, G. P. Kaur, K. *et al.*. (2006). *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Time-of-Flight Mass Spectrometry in Genomics Research*, PLoS Genetics, 2, 0920-0929
- Rajan, S., Jagatheesan, G., Karam, C. N. *et al.*. (2010). *Molecular and Functional Characterization of a Novel Cardiac Specific Human Tropomyosin Isoform*. Circulation, 121(3), 1-18
- Richard, P., Fressart, V., Charron, P. *et al.*. (2010). *Génétique des cardiomyopathies héréditaires (Genetics of inherited cardiomyopathies)*. Pathologie Biologie. 58, 343-352
- Rodríguez, J. E., McCudden, C. R. e Willis, M. S.. (2009). *Familial hypertrophic cardiomyopathy: Basis concepts and future molecular diagnostics*. Clinical Biochemistry Elsevier, 42, 755-765
- SA Medical <http://samedical.blogspot.com/2010/07/contraction-of-skeletal-muscle.html> acessado a 09 de Janeiro de 2012
- Santos, S., Lança, V., Fernandes, A. R. *et al.*. (2011). *Genetic Diagnostic of Hypertrophic Cardiomyopathy using Mass Spectrometry DNA Arrays and High Resolution Melting*. Revista Portuguesa de Cardiologia, 30 (01), 7-18
- Santos, S., Lança, V., Oliveira, H., Branco, P., Silveira, L., Marques, V., Brito, D., Madeira, H., Bicho, M. e Fernandes, A. R.. (2011). *Genetic Diagnosis of Hypertrophic Cardiomyopathy using Mass Spectrometry DNA Arrays and High Resolution Melting*. Revista Portuguesa de Cardiologia, 30 (01), 7-18.
- Saditok, T., Hammond C. R. e Ferrari, M. B.. (2010). *Distinct Roles for Telethonin N- Versus C-Terminus in Sarcomere Assembly and Maintenance*. Developmental Dynamics, 239, 1124-1135

- Sauer, S., Gelfand, D. H., Boussicault, F. *et al.*. (2002). *Facile method for automated genotyping of single nucleotide polymorphisms by mass spectrometry*. Nucleic Acids Research, 30, 1-5
- Seidman, C. e Seidman, J. G.. (2011). *Identifying Sarcomere Gene Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy: A Personal History*. Circulation Research, 108, 743-750
- Seidman, J. G. e Seidman, C.. (2001). *The Genetics Basis for Cardiomyopathy: from Mutation Identification to Mechanisms Paradigms*. Cell, 104, 557-567
- Semsarian, C., Ahmad, I., Giewat, M. *et al.*. (2002). *The L-type calcium channel inhibitor diltiazem prevents cardiomyopathy in a mouse model*. J. Clin. Invest, 109, 1013–1020
- Sequenom®. (2007). *iPLEX™ Gold Application Guide*. Sequenom®, Versão 1, Revisão 1
- Sequenom®. (2007). *Typer 4.0 User's Guide*. Sequenom®
- Sigma Aldrich <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/tropomyosin.html> acessado a 30 de Agosto de 2011
- Söderlund-Strand, A., Dillner, J. e Carlson, J.. (2008). *High-Throughput Genotyping of Oncogenic Human Papilloma Viruses with MALDI-TOF Mass Spectrometry*. Clinical Chemistry, 54, 86-92
- Sorajja, P., Elliott, P. e McKenna, W.. (2000). *The molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy: prognostic implications*. Europace, 2, 4-14
- Tadiff, J. C., Hewett, T. E., Palmer, B. M.. (1999). *Cardiac troponin T mutations result in allele-specific phenotypes in a mouse model for hypertrophic cardiomyopathy*. The Journal of Clinical Investigation, 104, 469-481
- Vainzof, M., Moreira, E. S., Suzuki, O. T. *et al.*. (2002). *Telethonin protein expression in neuromuscular disorders*. Biochimica et Biophysica Acta, 1588, 33– 40
- Van Driest, S. L., BA, Vasile, V. C. *et al.*. (2004). *Myosin Binding Protein C Mutations and Compound Heterozygosity in Hypertrophic Cardiomyopathy*. Journal of the American College of Cardiology, 44, 1903–10
- Watkins, H., Ashrafian. H. e Redwood, C.. (2011). *Inherited Cardiomyopathies*. The New England Journal of Medicine, 364, 1643-1656
- Wang, C. L. A. e Coluccio, L. M. (2010). *New Insights into the Regulation of the Actin Cytoskeleton by Tropomyosin*. Cell Mol Biol, 281, 91–128

- Wheeler, M., Pavlovic, A., DeGoma, E. *et al.*. (2009). *A New Era in Clinical Genetic Testing for Hypertrophic Cardiomyopathy*. Journal of cardiovascular Trans. Res, 2, 381-391
- Wolska, B. M. e Wieczorek, D. F.. (2003). *The role of tropomyosin in the regulation of myocardial contraction and relaxation*. Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 446, 1-8
- Wright, WT., Heggarty, SV., Young, IS.. (2008). *Multiplex MassARRAY spectrometry (iPLEX) produces a fast and economical test for 56 familial hypercholesterolaemia-causing mutations*. Clin Genet, 74, 463-468
- Yacoub, M. H., El-Hamamsy, I., Said, K. *et al.*. (2009). *The Left Ventricular Outflow in Hypertrophic Cardiomyopathy: From Structure to Function*, Journal of Cardiovascular Translational Research, 2, 510-517

8. Anexos

Anexo A

Plate Result Report					
Ensaio 1 - Plex 1					
Poço	Mutação	Genótipo	Descrição	Amostra	Operador
A01	ACTC1_CM13	G	Conservativo (A)	1	Automático
A01	ACTC1_CM14	G	Conservativo (A)	1	Automático
A01	MTCYB_G1		Sem alelos (N)	1	Automático
A01	MTTG_T1	T	Conservativo (A)	1	Automático
A01	MTTI_A1	A	Moderado (B)	1	Automático
A01	MYBPC3_CD1	T	Conservativo (A)	1	Automático
A01	MYBPC3_CD4	C	Conservativo (A)	1	Automático
A01	MYBPC3_CD6		Baixa probabilidade (D)	1	Automático
A01	MYBPC3_CD3	T	Conservativo (A)	1	Automático
A01	MYBPC3_CD2	GGCACACG	Moderado (B)	1	Automático
A01	MYBPC3_C12	DEL	Moderado (B)	1	Automático
A01	MYBPC3_CM18		Baixa probabilidade (D)	1	Automático
A01	MYBPC3_CM5	C	Conservativo (A)	1	Automático
A01	MYBPC3_CM17	G	Agressivo (C)	1	Automático
A01	MYBPC3_CM16	C	Moderado (B)	1	Automático
A01	MYBPC3_CM3		Sem alelos (N)	1	Automático
A01	MYBPC3_CM394		Sem alelos (N)	1	Automático

Anexo 1

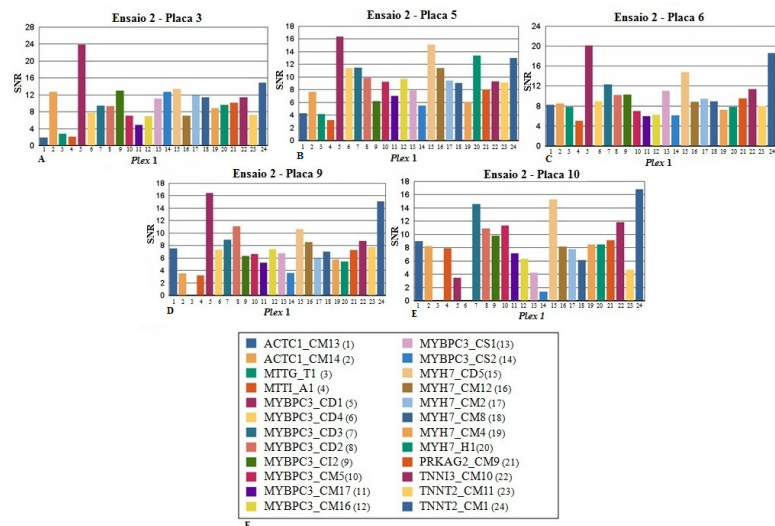


Figura 8.1 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 1 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 24 mutações analisadas neste plex 1. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 2

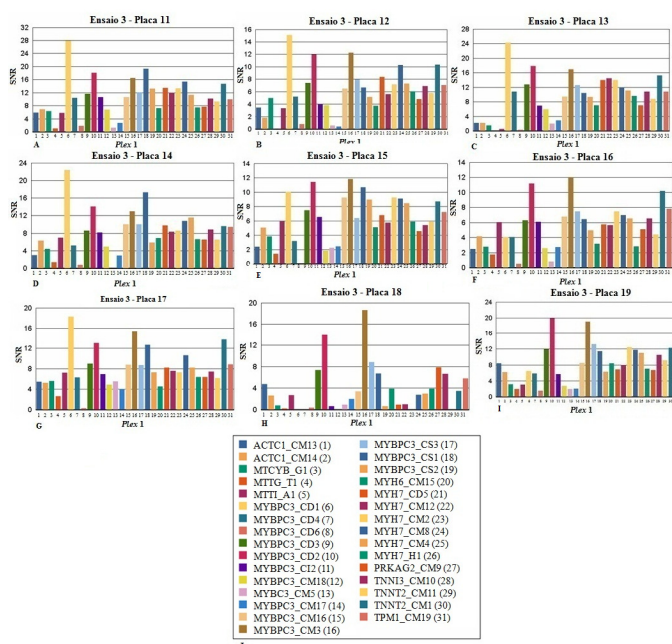


Figura 8.2 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 1 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 31 mutações analisadas neste plex 1. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I

Anexo 3

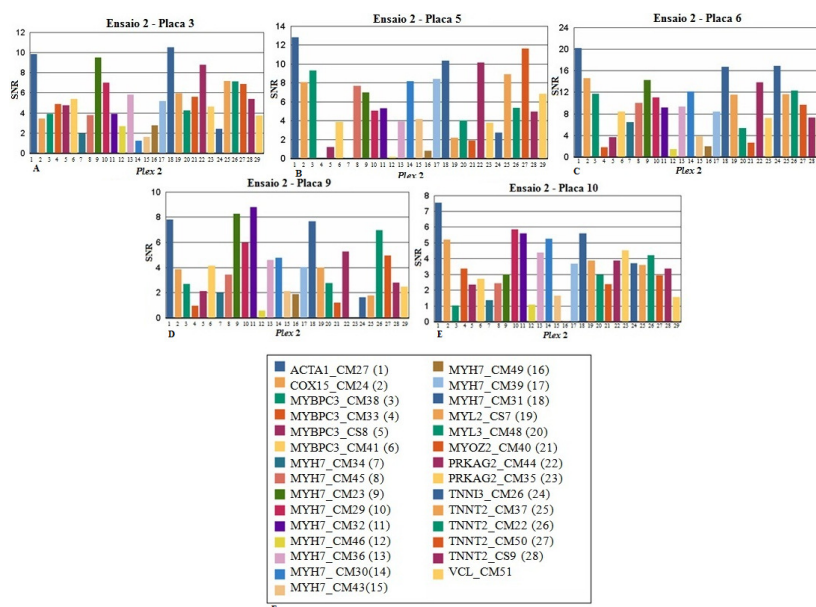


Figura 8.3 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 2 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 29 mutações analisadas neste plex 2. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 4

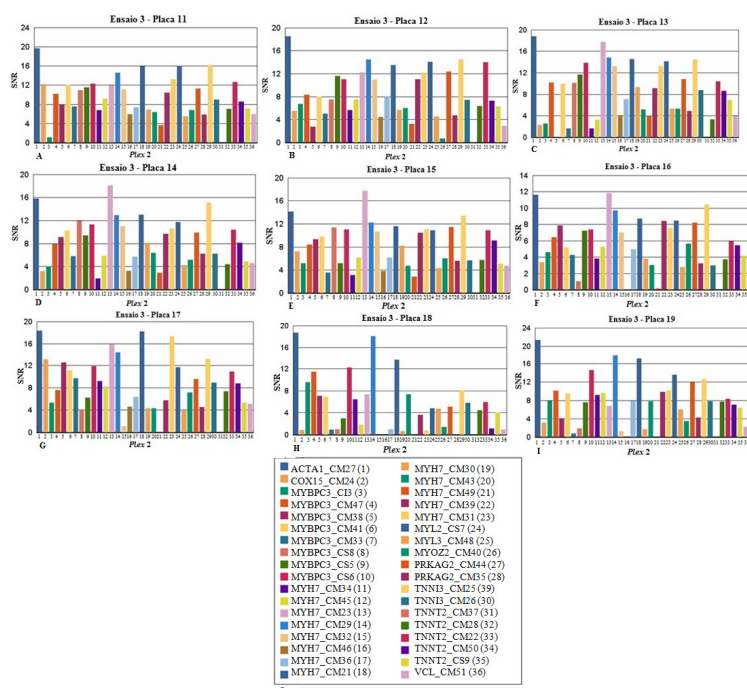


Figura 8.4 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 2 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 36 mutações analisadas neste plex 2. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 5

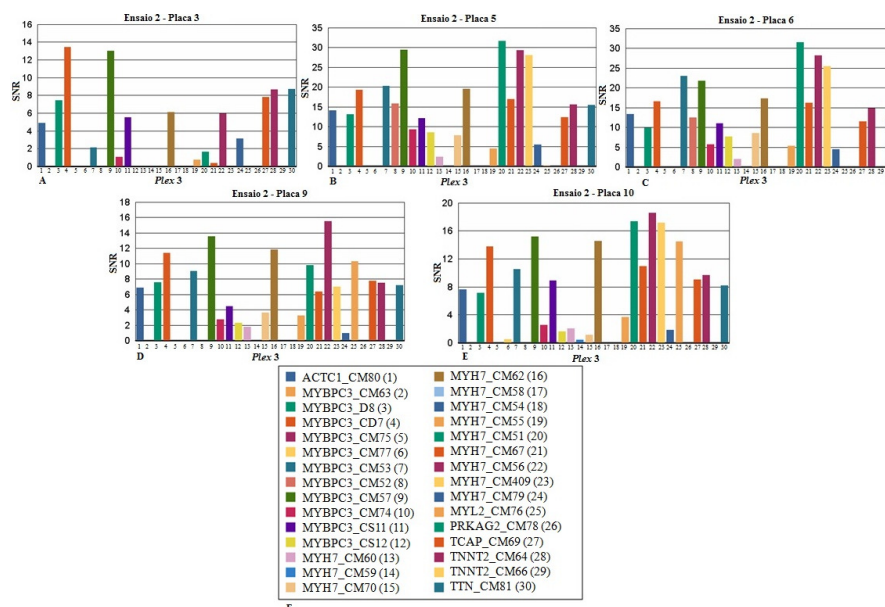


Figura 8.5 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 3 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 30 mutações analisadas neste plex 2. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 6

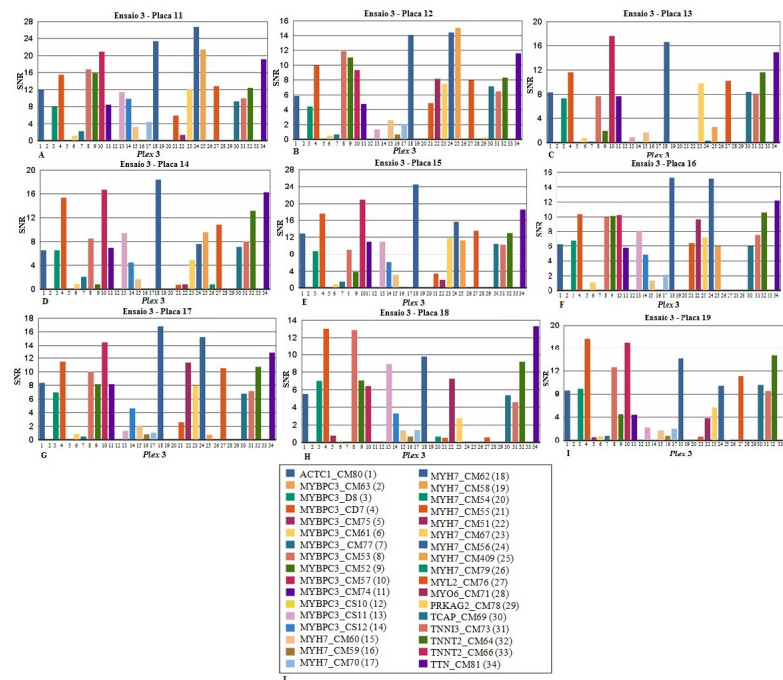


Figura 8.6 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 3 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 30 mutações analisadas neste plex 3. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 7

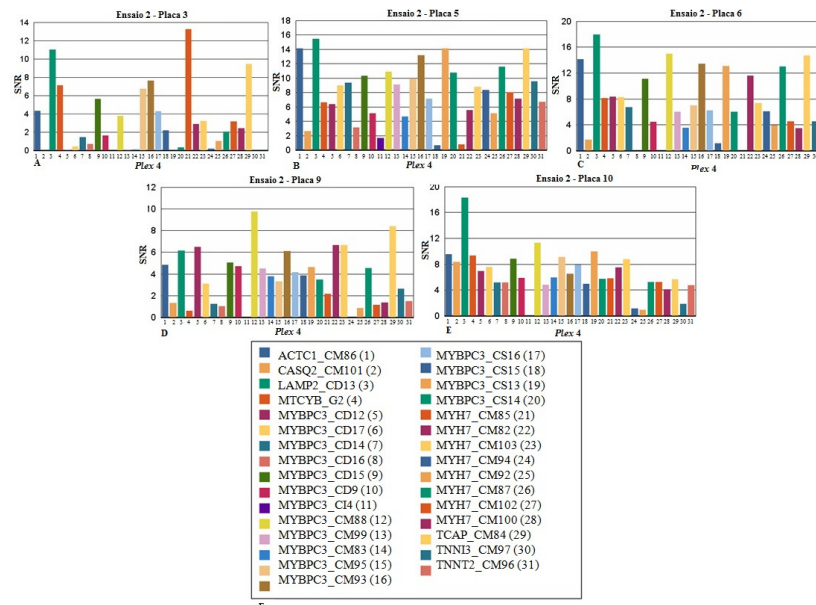


Figura 8.7 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 4 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 31 mutações analisadas neste plex 4. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 8

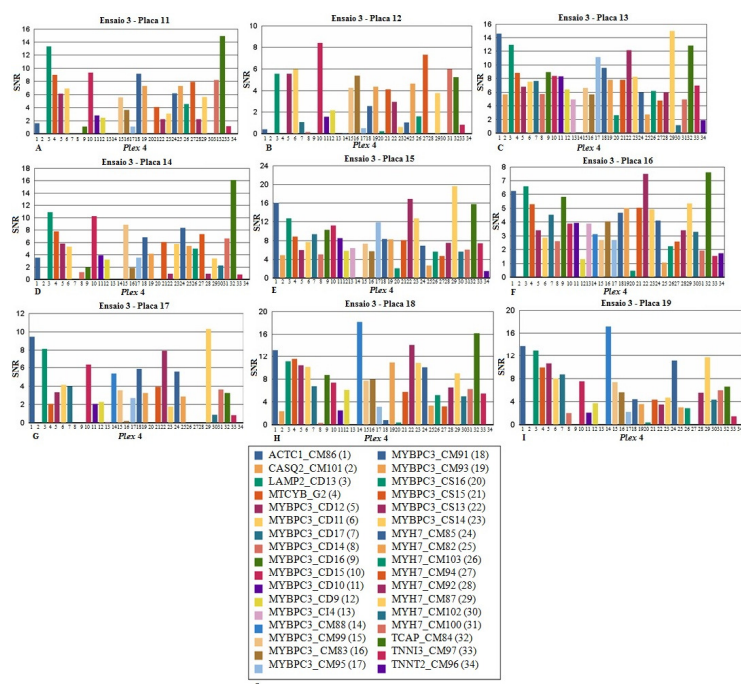


Figura 8.8 – Figura A-I - *Primer Adjustment Report* para o *plex 4* no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 34 mutações analisadas neste *plex 4*. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 9

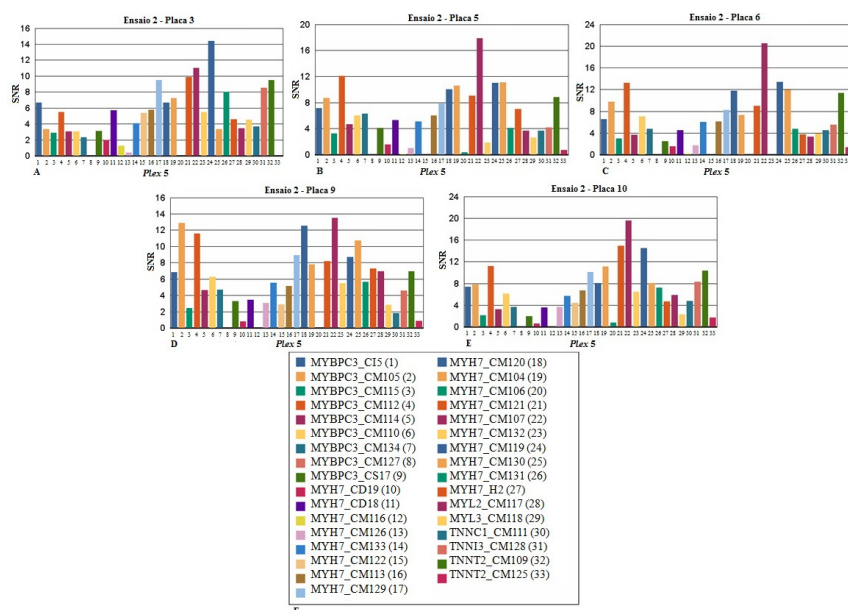


Figura 8.9 – Figura A-E - *Primer Adjustment Report* para o *plex 5* no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 33 mutações analisadas neste *plex 5*. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 10

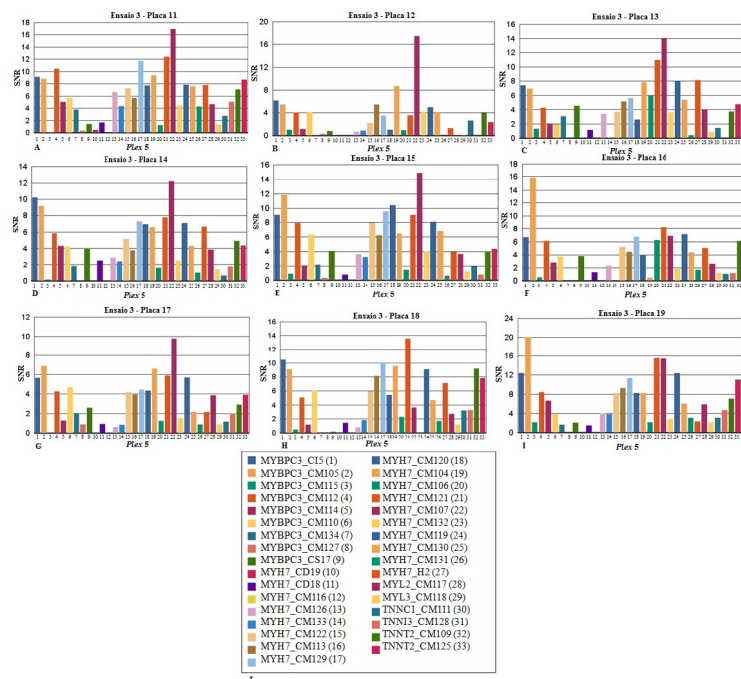


Figura 8.10 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 5 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 33 mutações analisadas neste plex 5. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I

Anexo 11

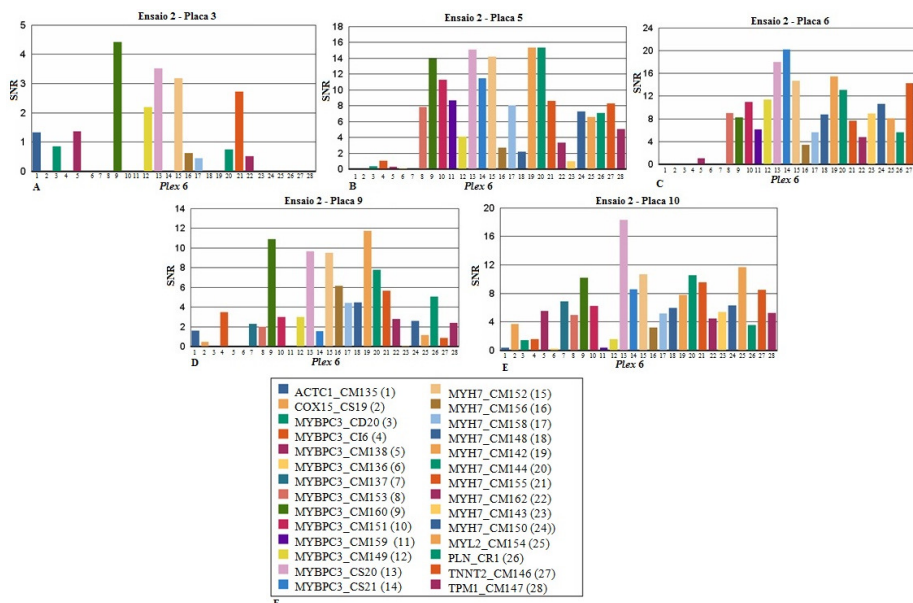


Figura 8.11 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 6 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 28 mutações analisadas neste plex 6. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 12

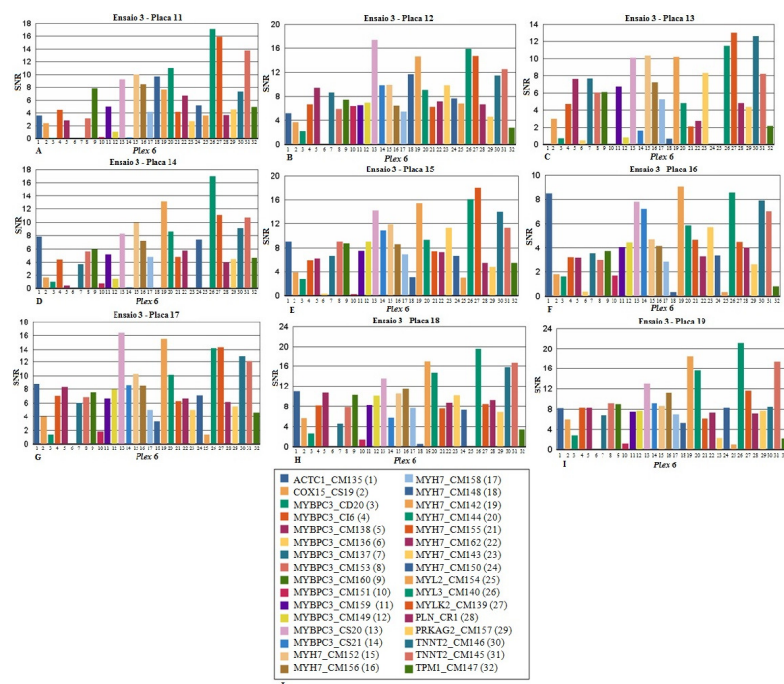


Figura 8.12 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 6 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 32 mutações analisadas neste plex 6. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 13

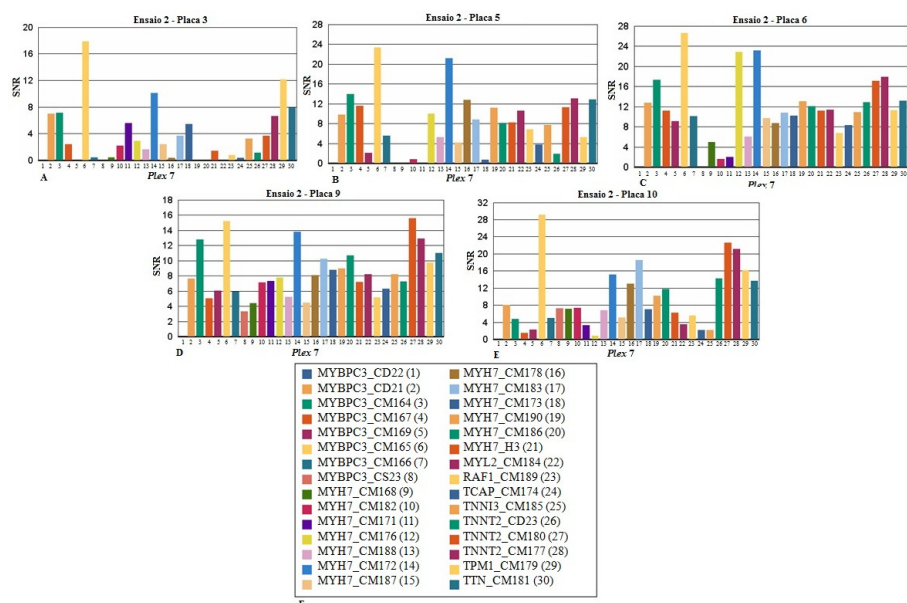


Figura 8.13 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 7 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 30 mutações analisadas neste plex 7. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 14

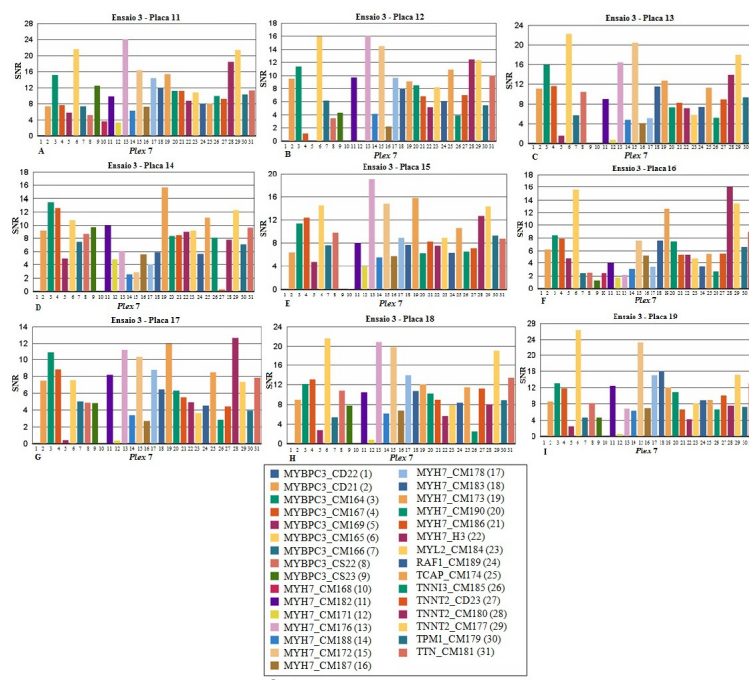


Figura 8.14 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 7 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 31 mutações analisadas neste plex 7. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 15

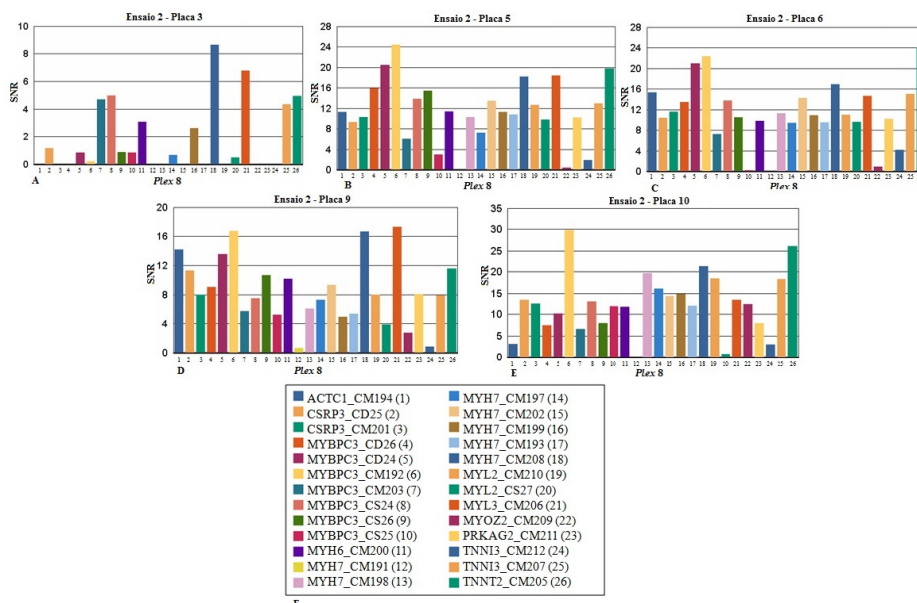


Figura 8.15 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 8 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 26 mutações analisadas neste plex 8. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 16

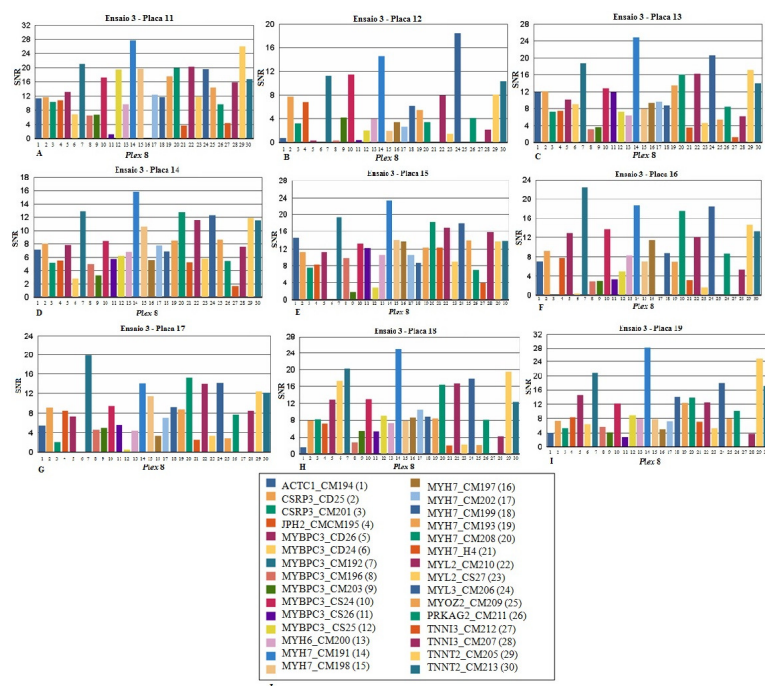


Figura 8.16 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 8 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 30 mutações analisadas neste plex 8. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 17

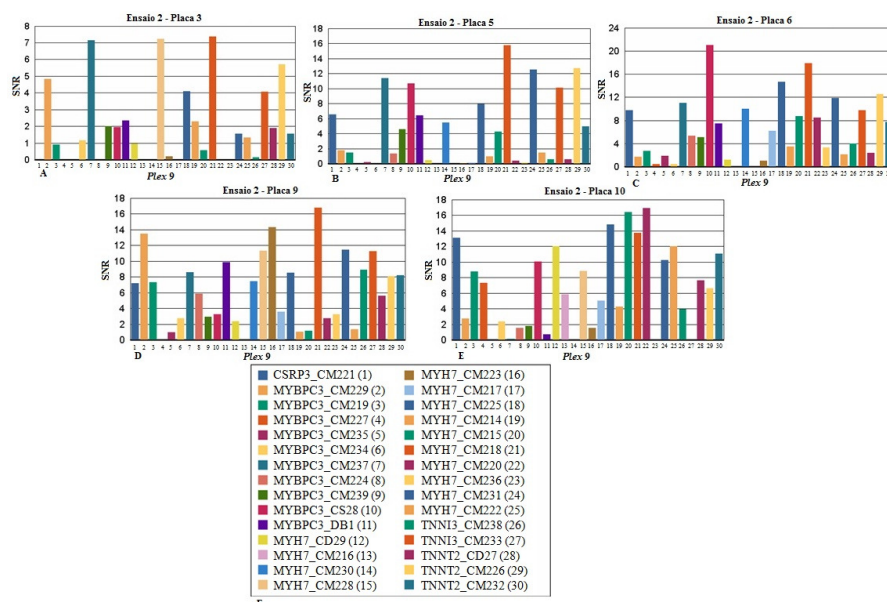


Figura 8.17 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 9 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 30 mutações analisadas neste plex 9. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 18

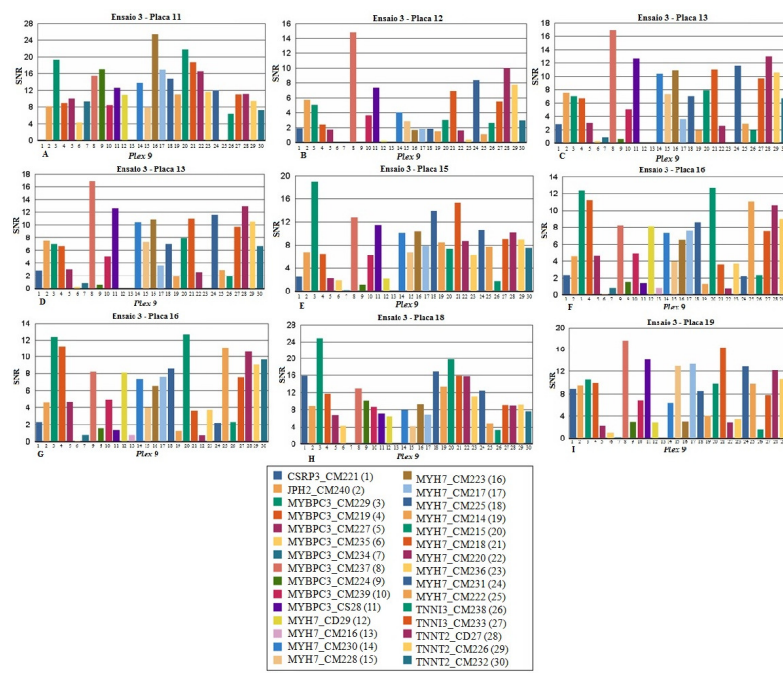


Figura 8.18 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 9 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 30 mutações analisadas neste plex 9. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I

Anexo 19

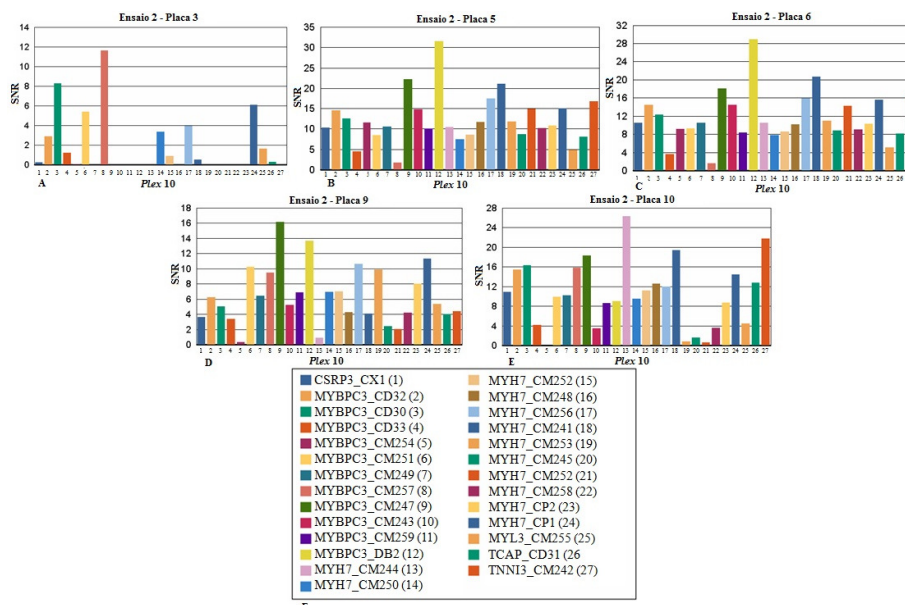


Figura 8.19 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 10 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 27 mutações analisadas neste plex 10. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 20

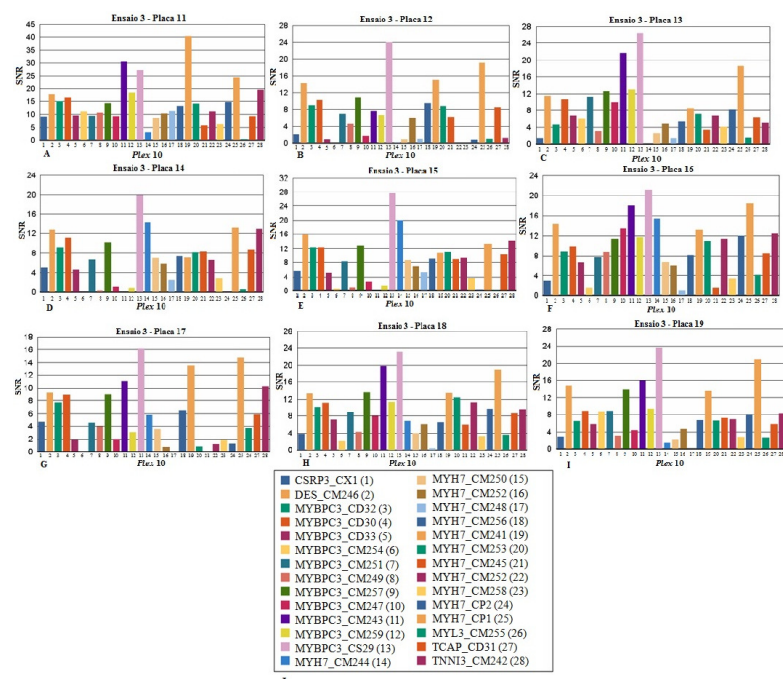


Figura 8.20 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 10 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 28 mutações analisadas neste plex 10. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 21

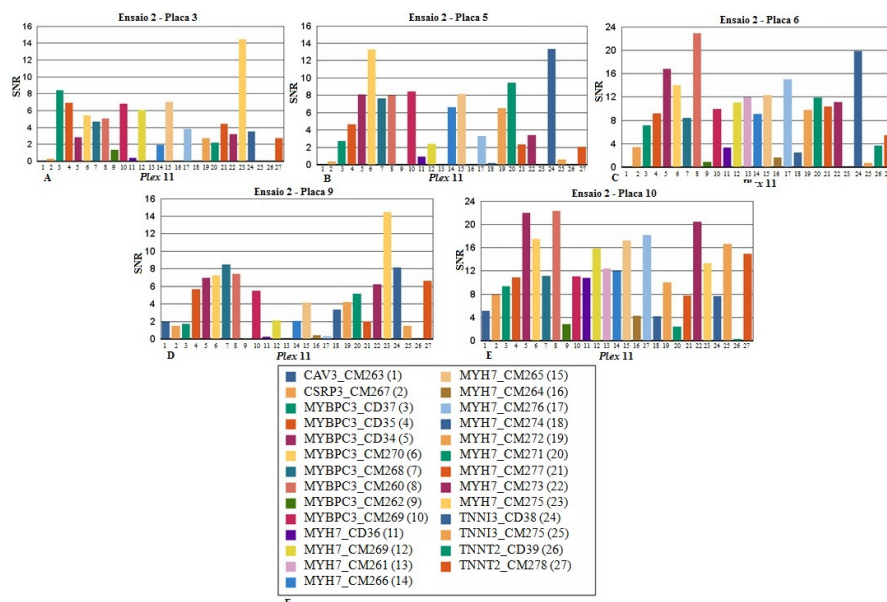


Figura 8.21 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 11 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 27 mutações analisadas neste plex 11. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 22

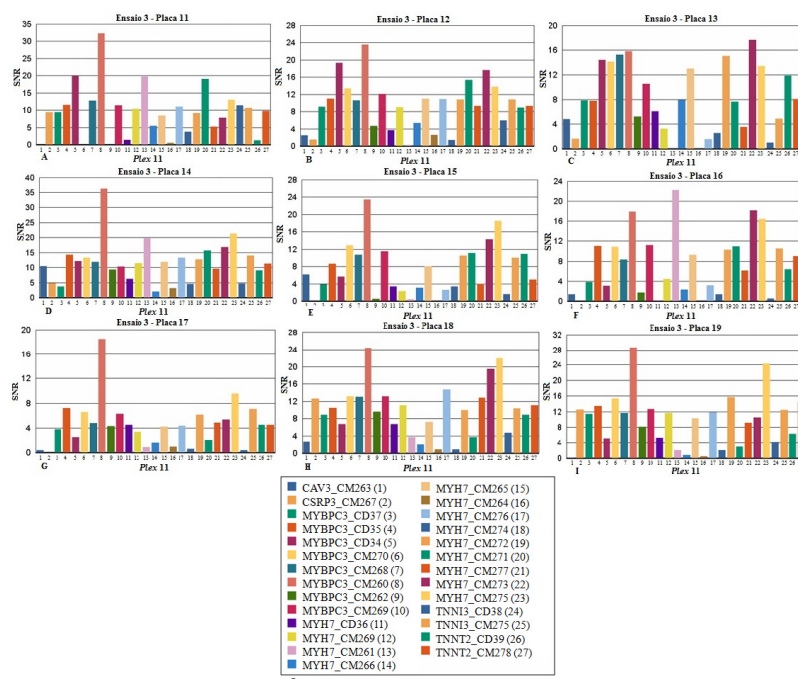


Figura 8.22 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 11 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 27 mutações analisadas neste *plex 11*. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 23

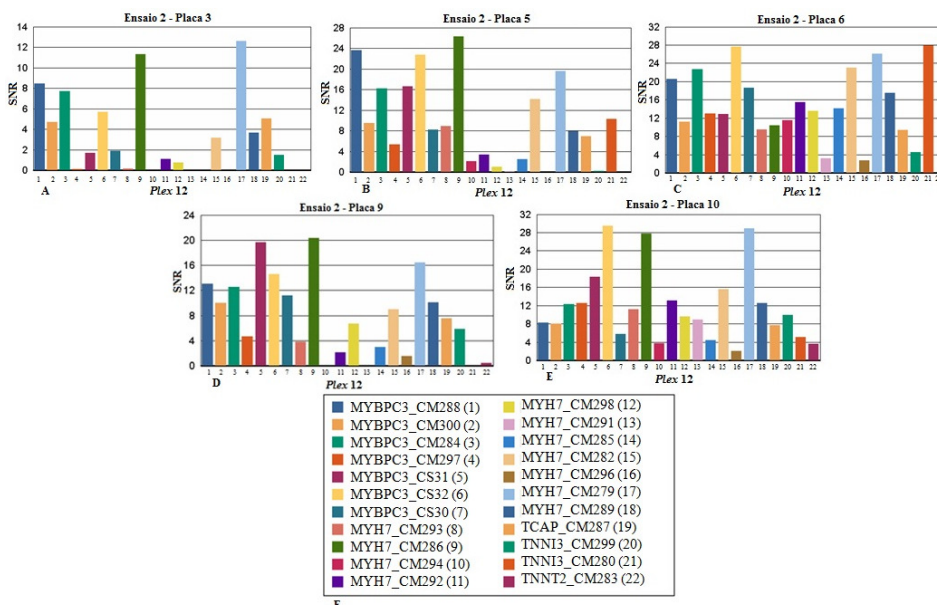
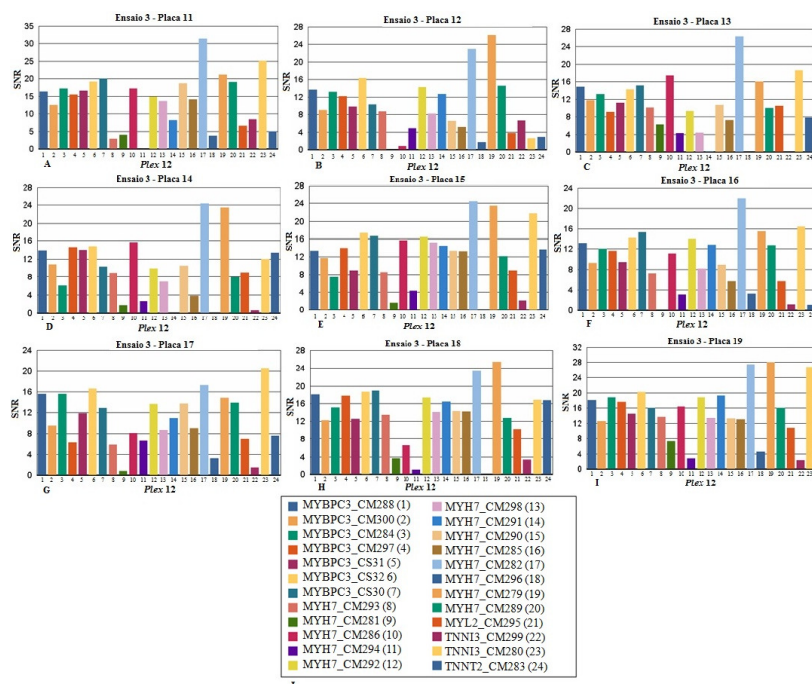


Figura 8.23 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 12 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 22 mutações analisadas neste *plex 12*. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 24



Anexo 25

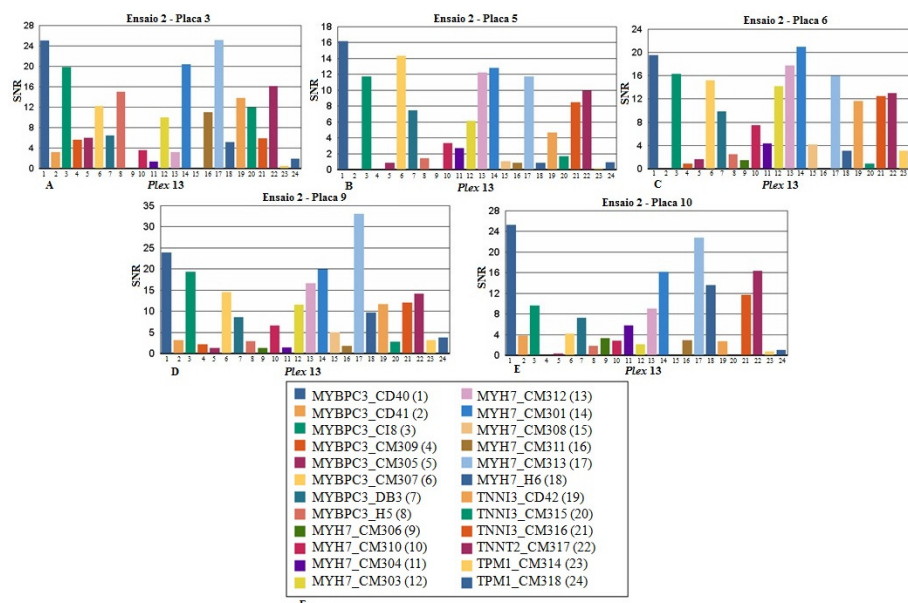


Figura 8.25 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 13 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 24 mutações analisadas neste plex 13. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 26

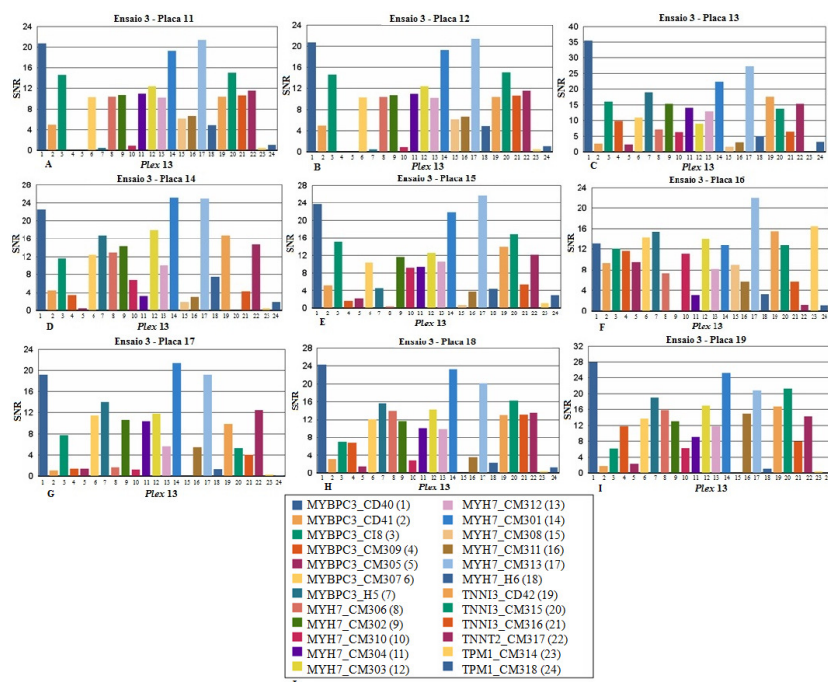


Figura 8.26 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 13 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 24 mutações analisadas neste plex 13. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 27

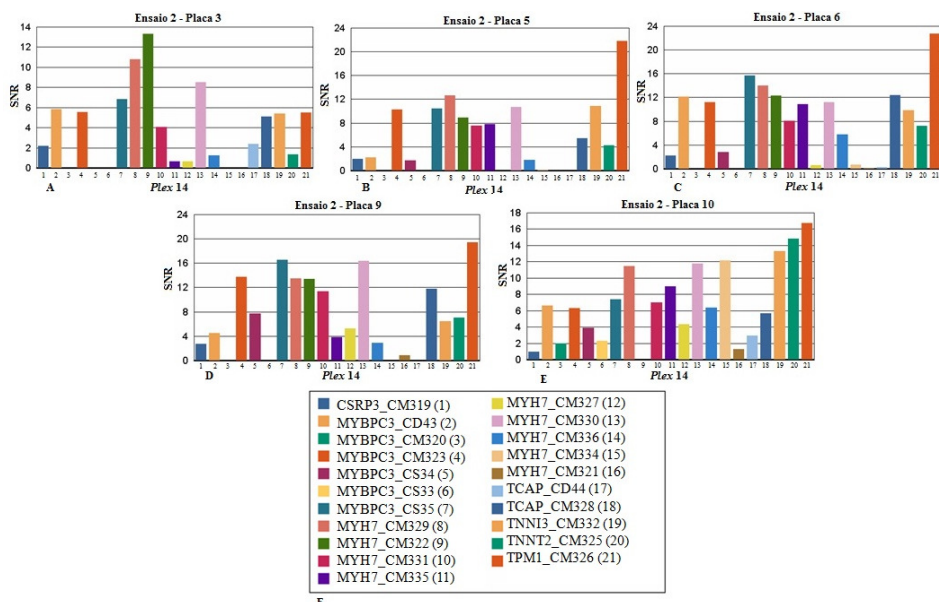


Figura 8.27 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 14 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 21 mutações analisadas neste plex 14. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 28

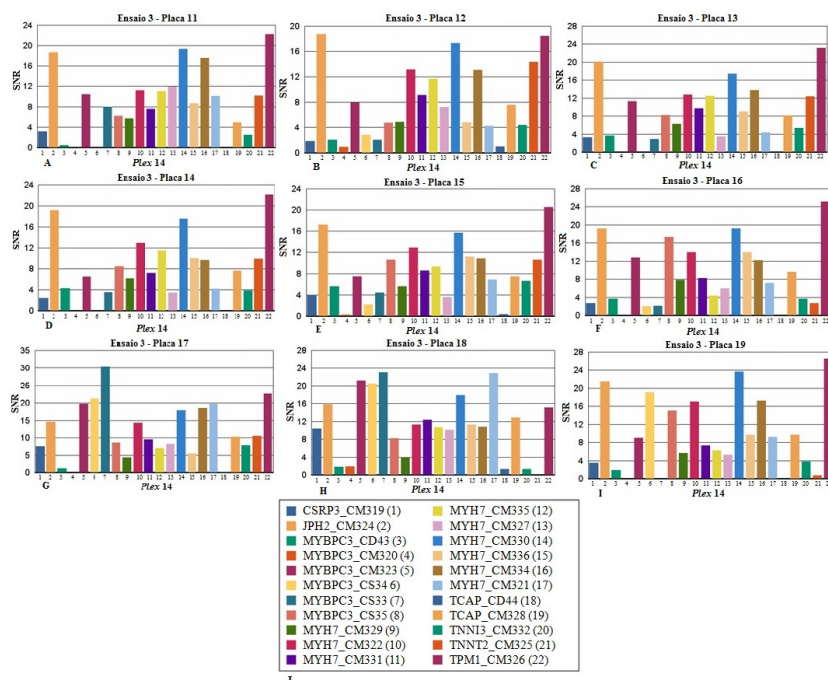


Figura 8.28 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 14 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 22 mutações analisadas neste *plex 14*. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 29

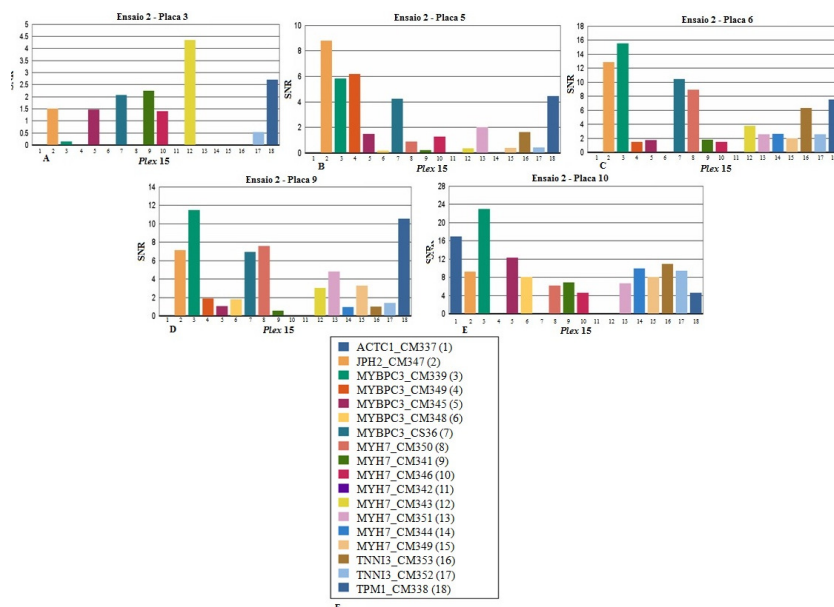


Figura 8.29 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 15 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 18 mutações analisadas neste *plex 15*. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 30

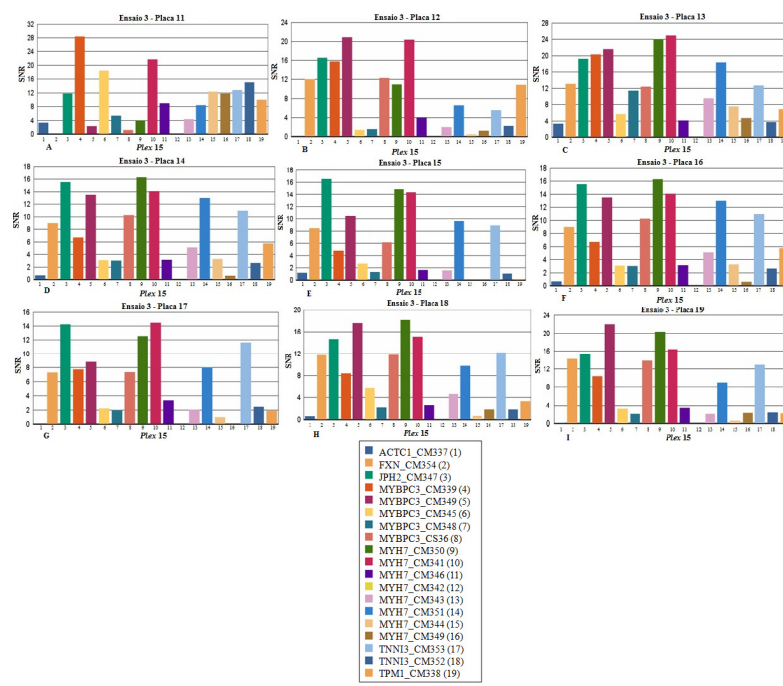


Figura 8.30 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 15 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 19 mutações analisadas neste *plex 15*. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 31

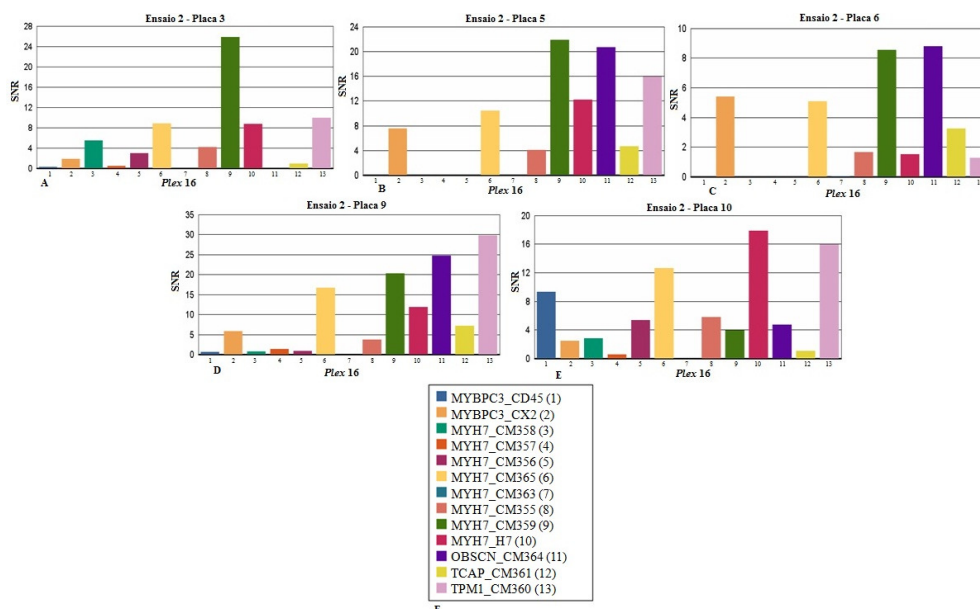


Figura 8.31 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 16 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 13 mutações analisadas neste *plex 16*. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 32

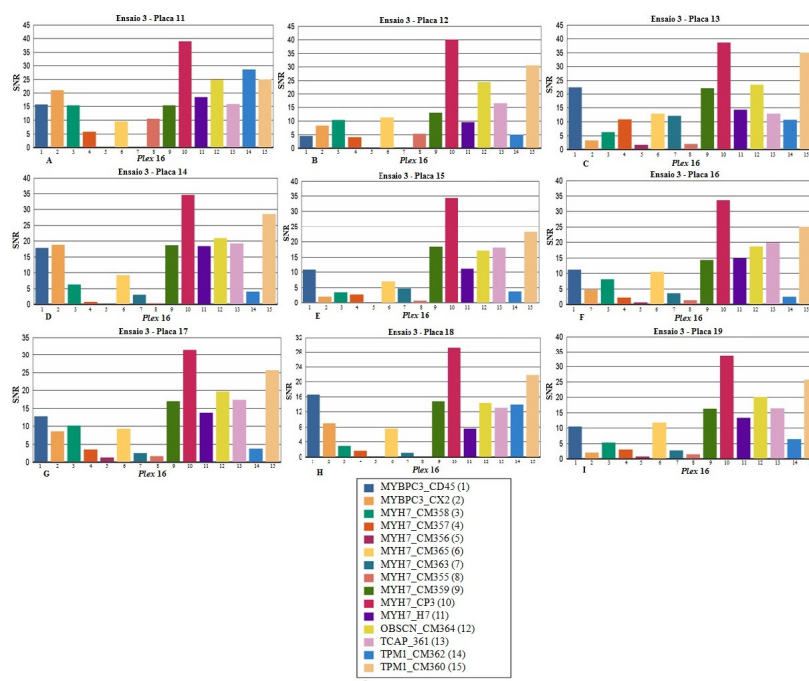


Figura 8.32 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 16 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 15 mutações analisadas neste plex 16. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 33

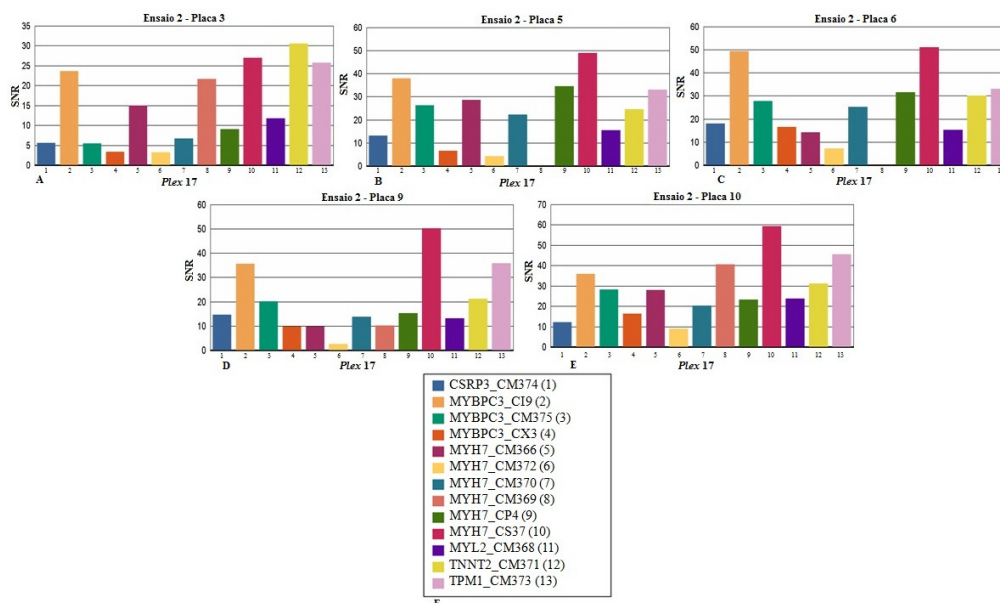
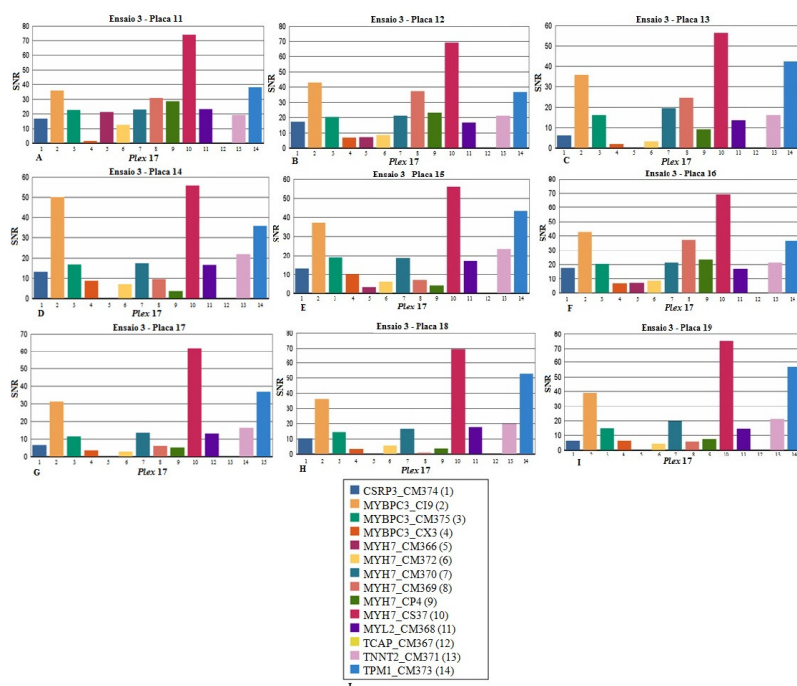


Figura 8.33 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 17 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 13 mutações analisadas neste plex 17. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 34



Anexo 35

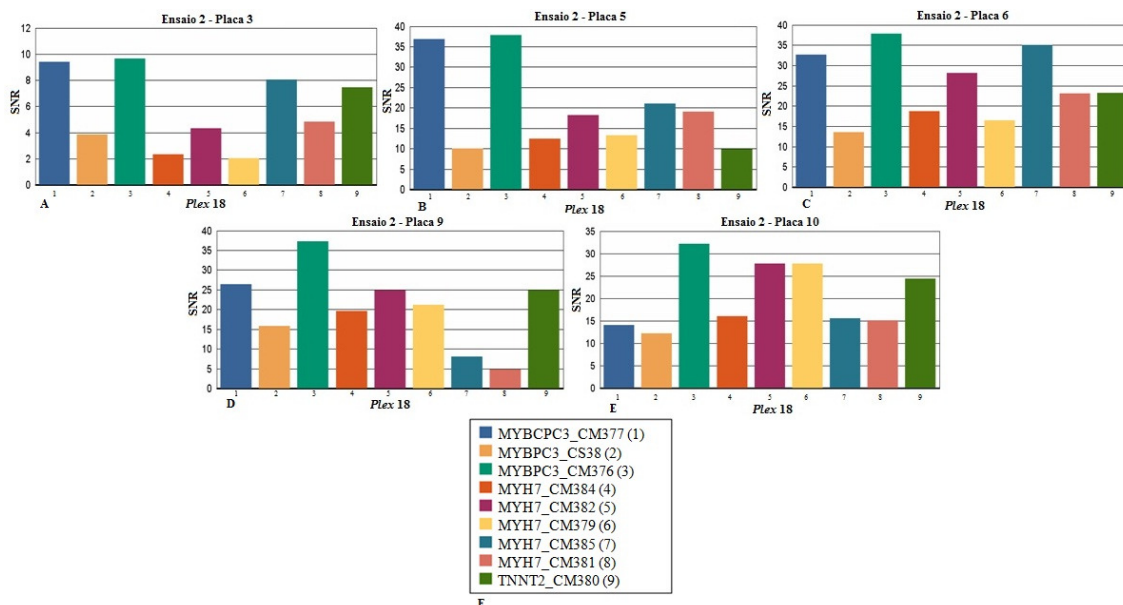


Figura 8.35 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 18 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 9 mutações analisadas neste plex 18. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 36

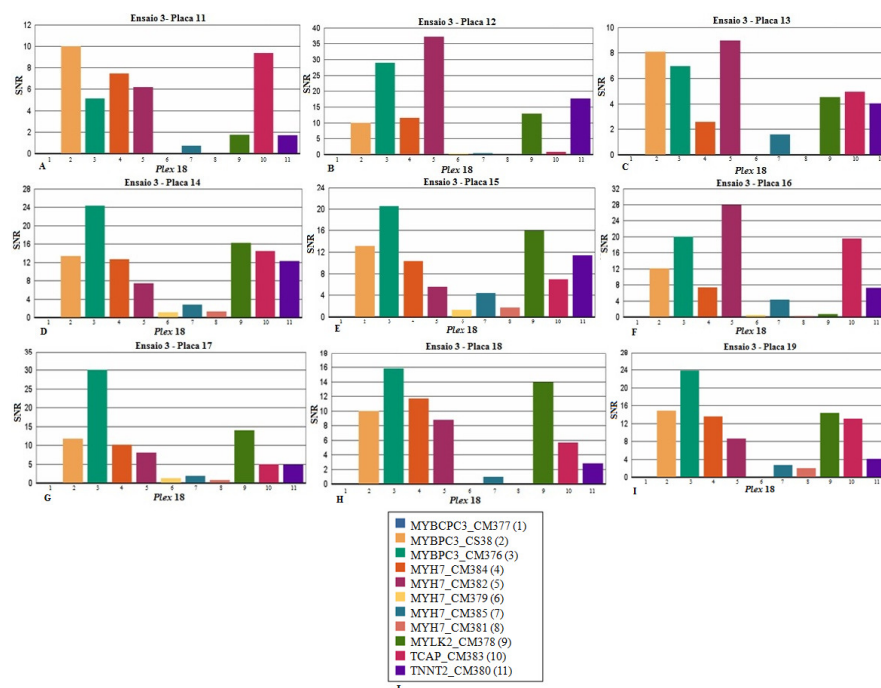


Figura 8.36 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 18 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 11 mutações analisadas neste *plex 18*. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 37

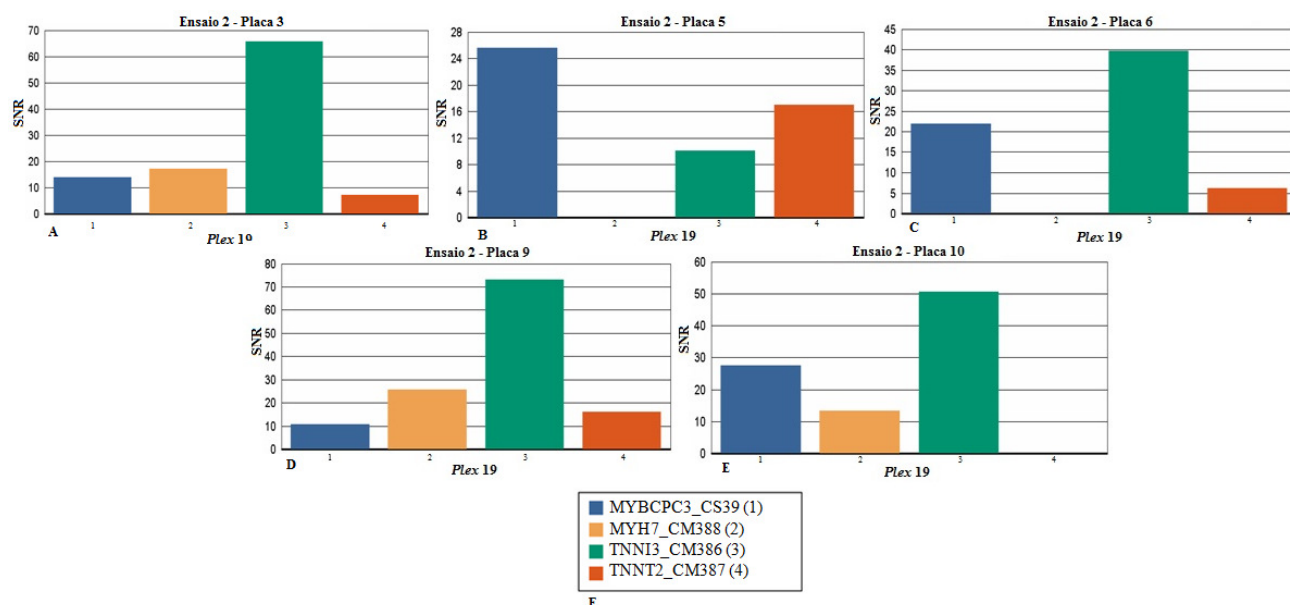


Figura 8.37 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 19 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 4 mutações analisadas neste *plex 19*. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 38

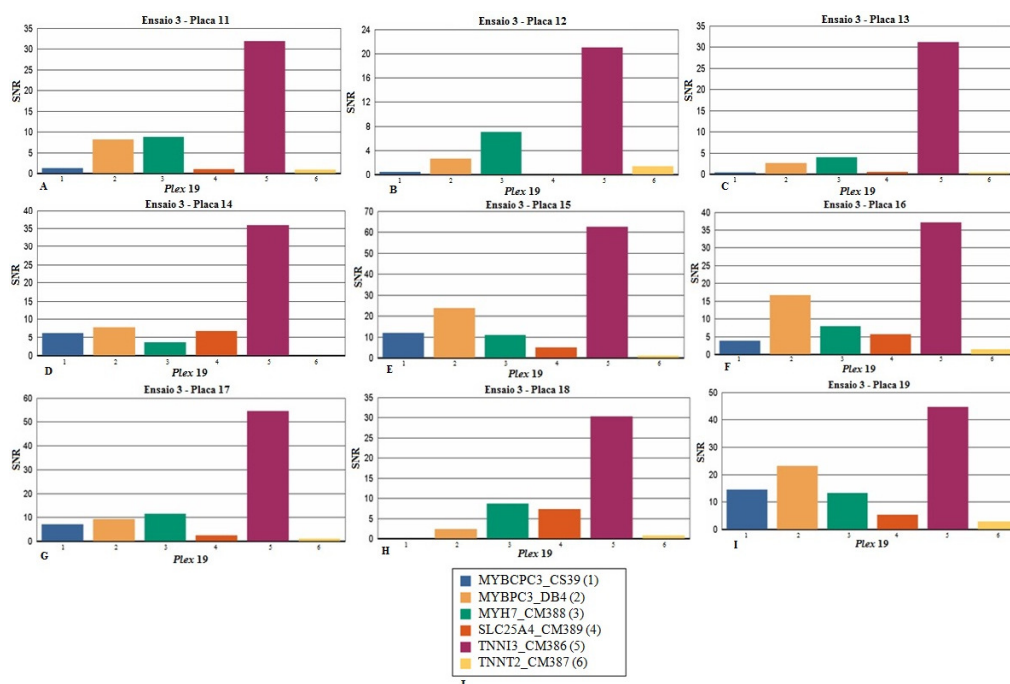


Figura 8.38 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 19 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 6 mutações analisadas neste plex 19. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 39

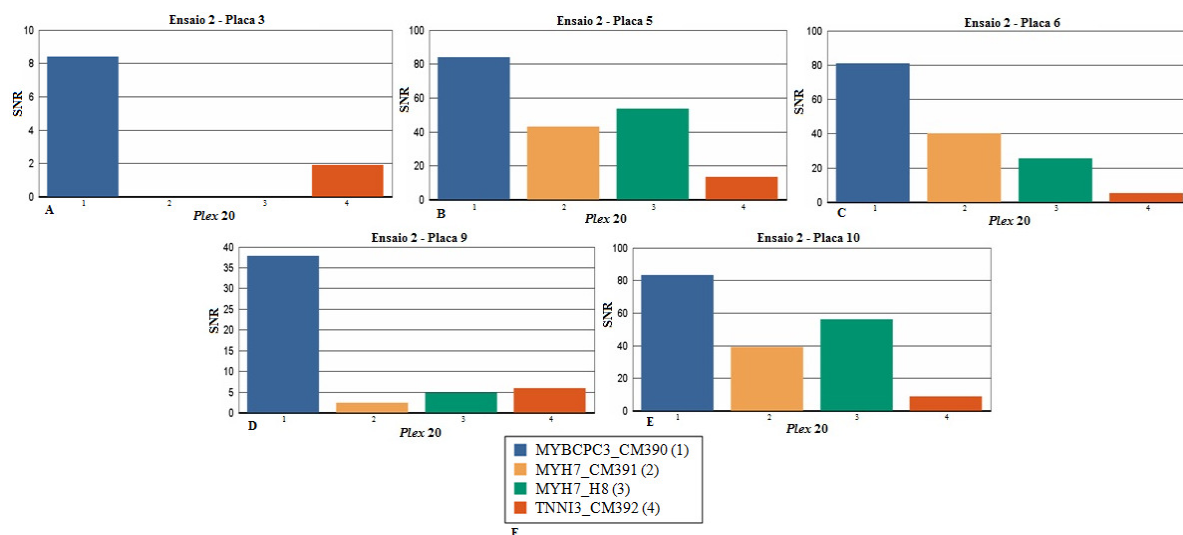


Figura 8.39 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 20 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 4 mutações analisadas neste plex 20. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 40

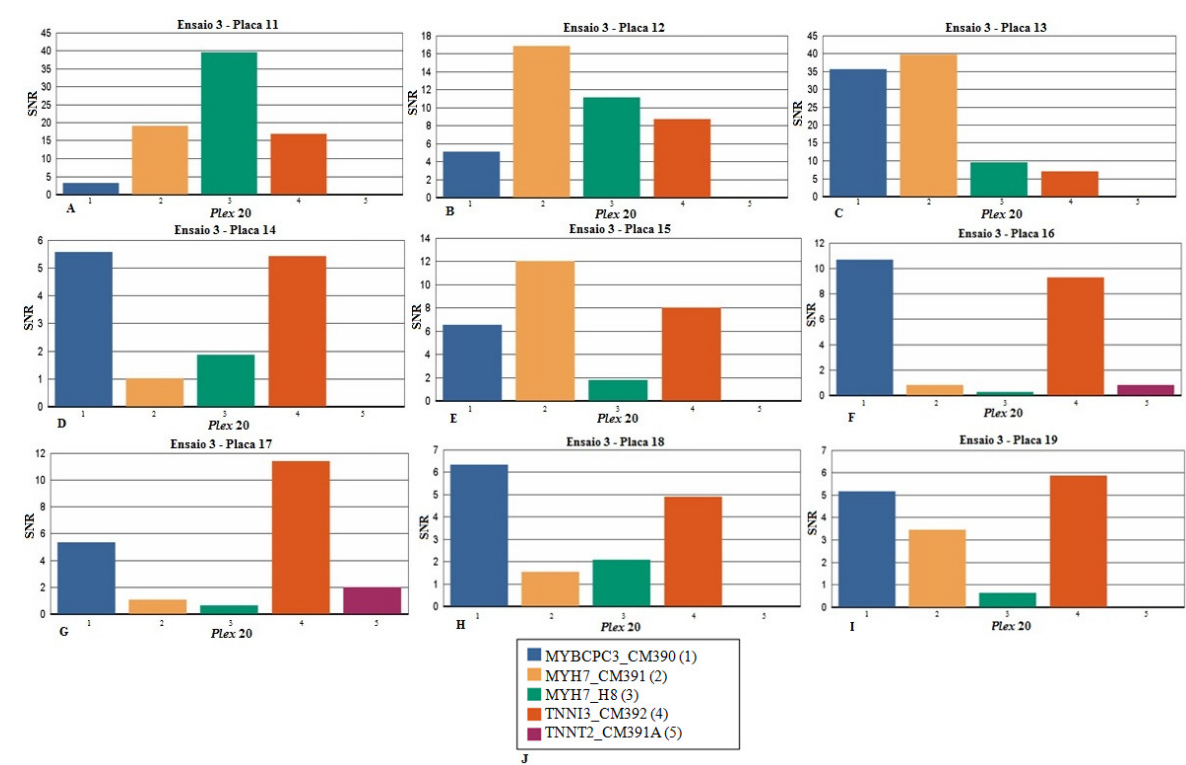


Figura 8.40 – Figura A-I - *Primer Adjustment Report* para o plex 20 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 5 mutações analisadas neste plex 20. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 41

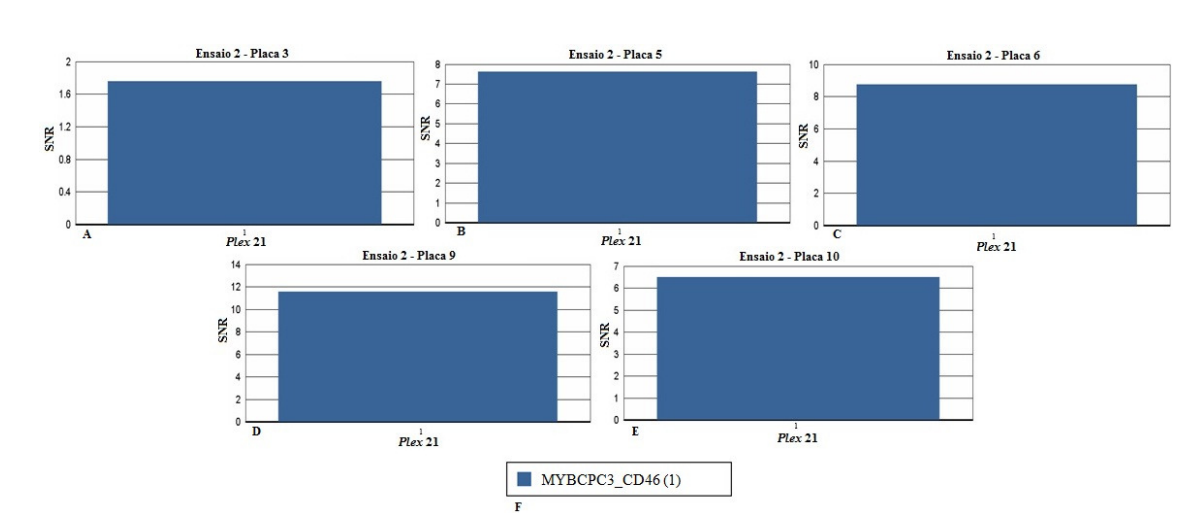


Figura 8.41 – Figura A-E - *Primer Adjustment Report* para o plex 21 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas a mutação analisada neste plex 21. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 42

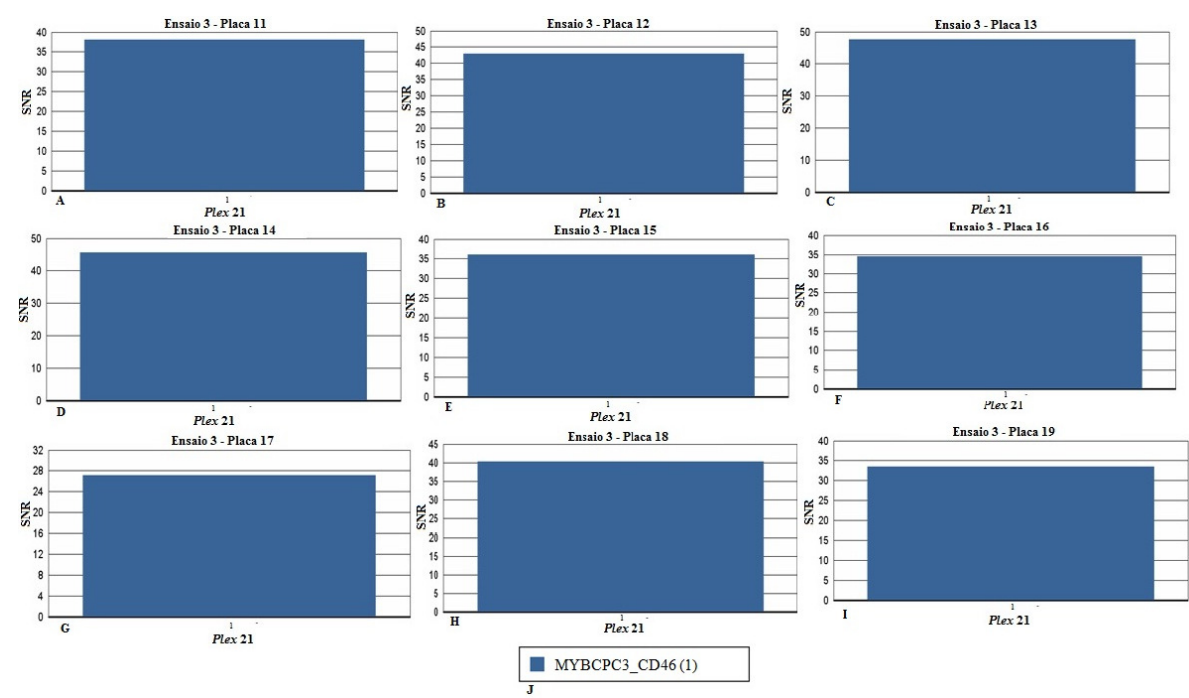


Figura 8.42 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 21 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas a mutação analisada neste *plex 21*. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 43

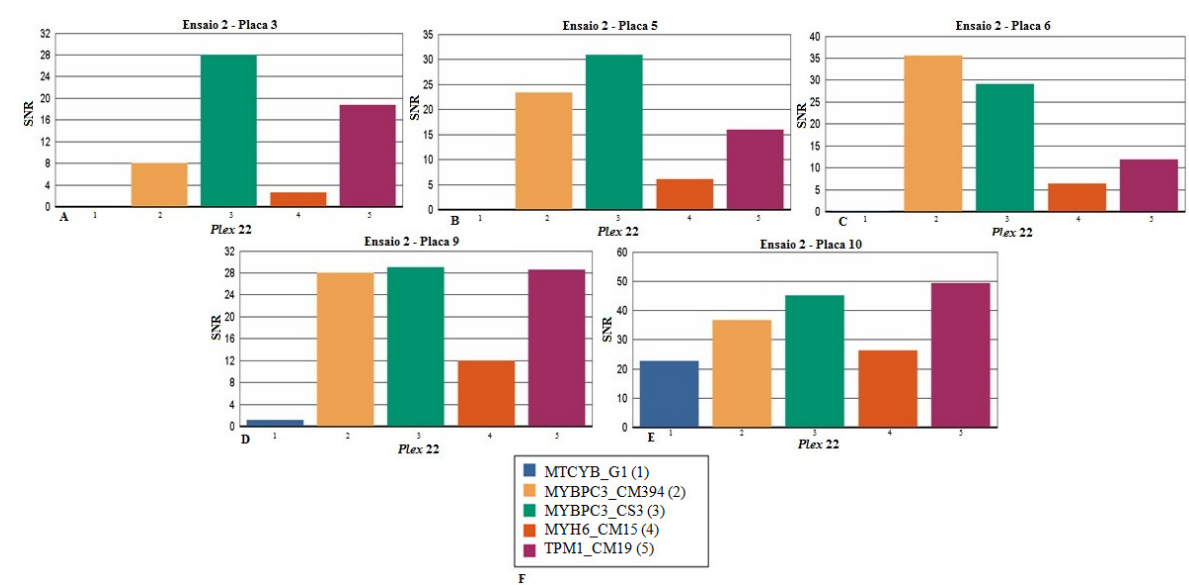
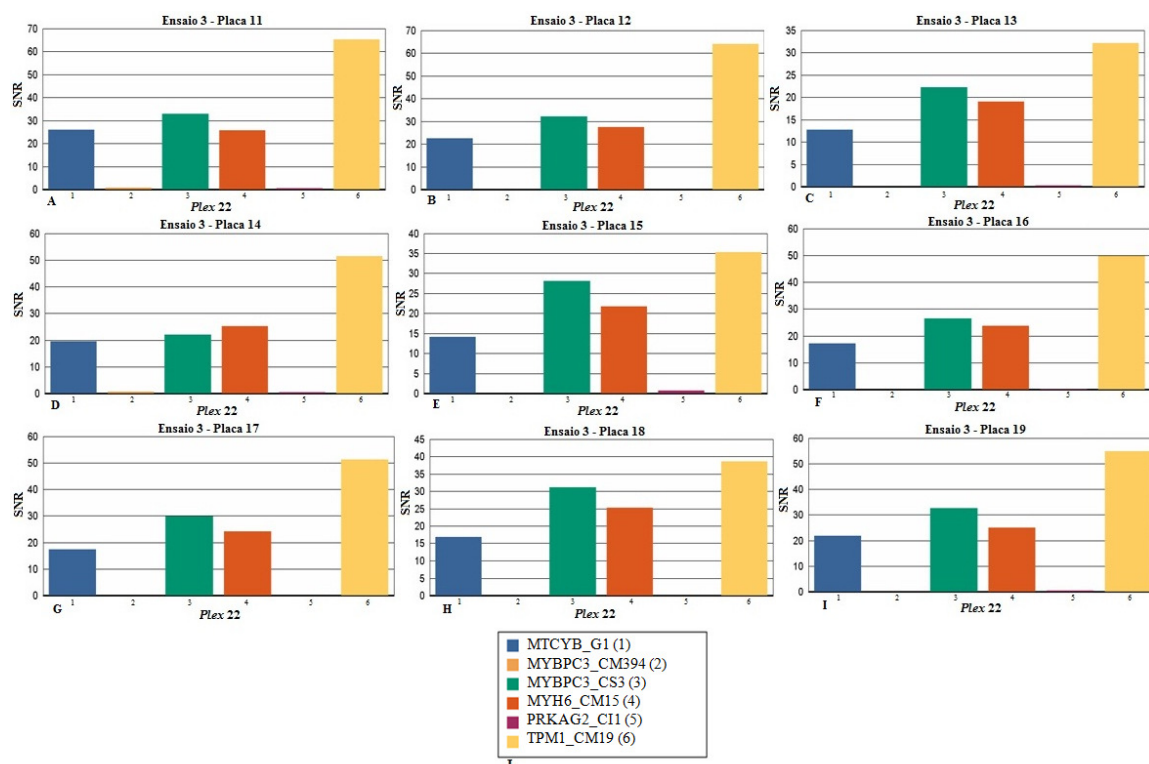
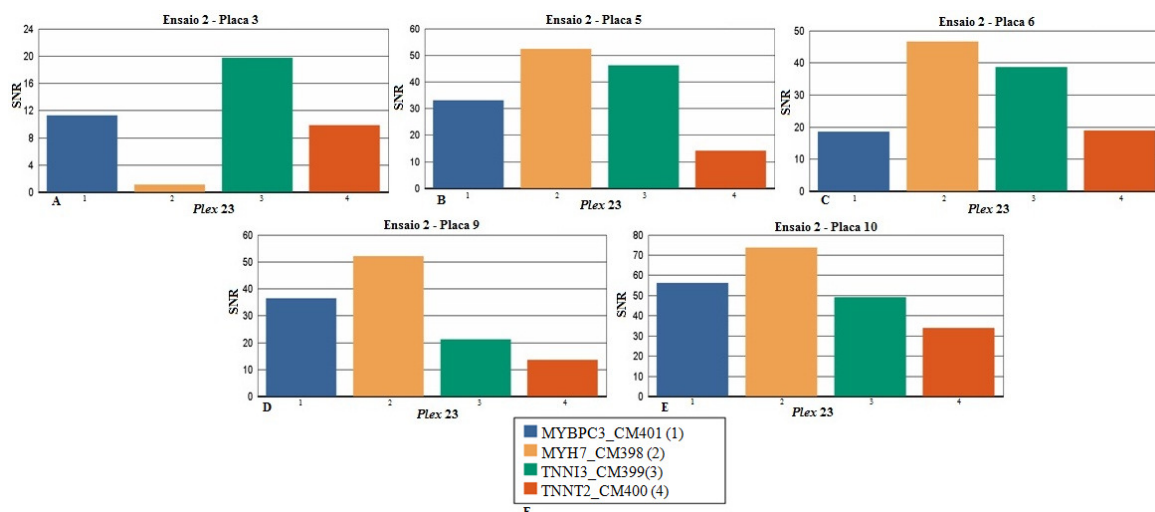


Figura 8.43 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 22 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 5 mutações analisadas neste *plex 22*. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 44



Anexo 45



Anexo 46

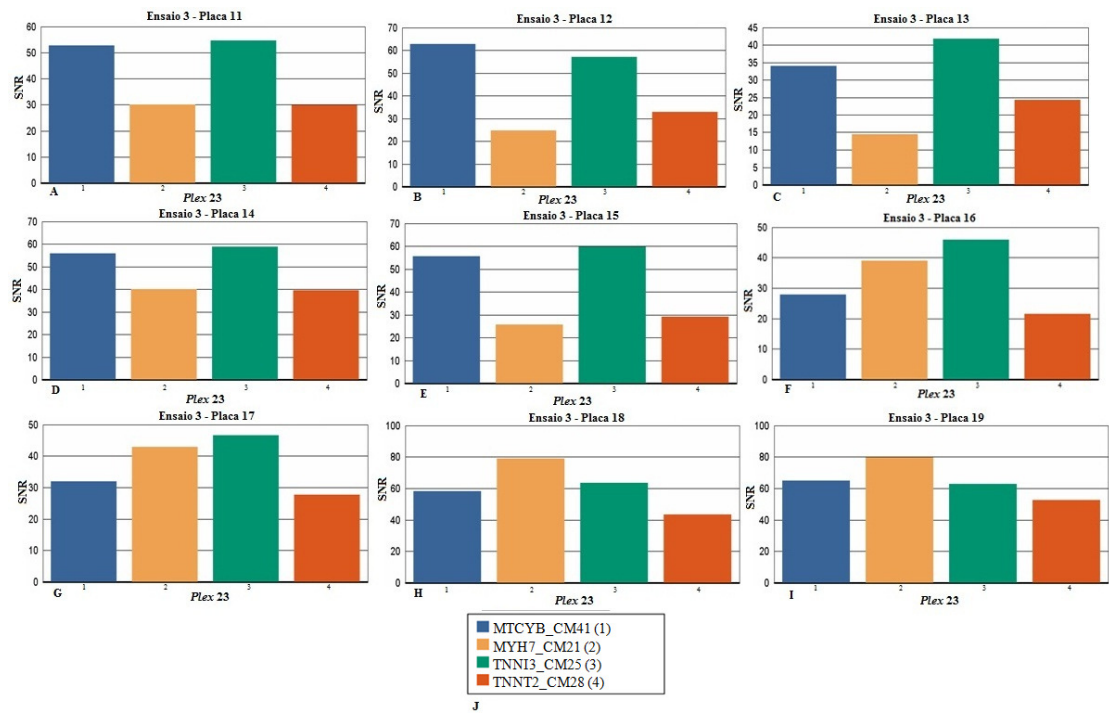


Figura 8.46 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 23 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 4 mutações analisadas neste *plex 23*. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 47

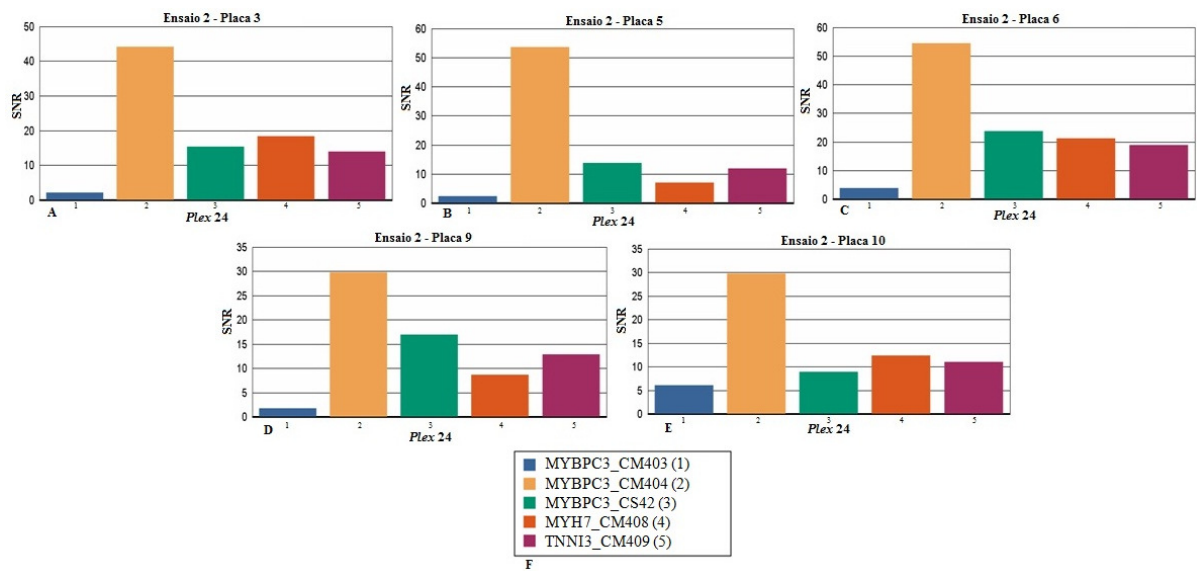
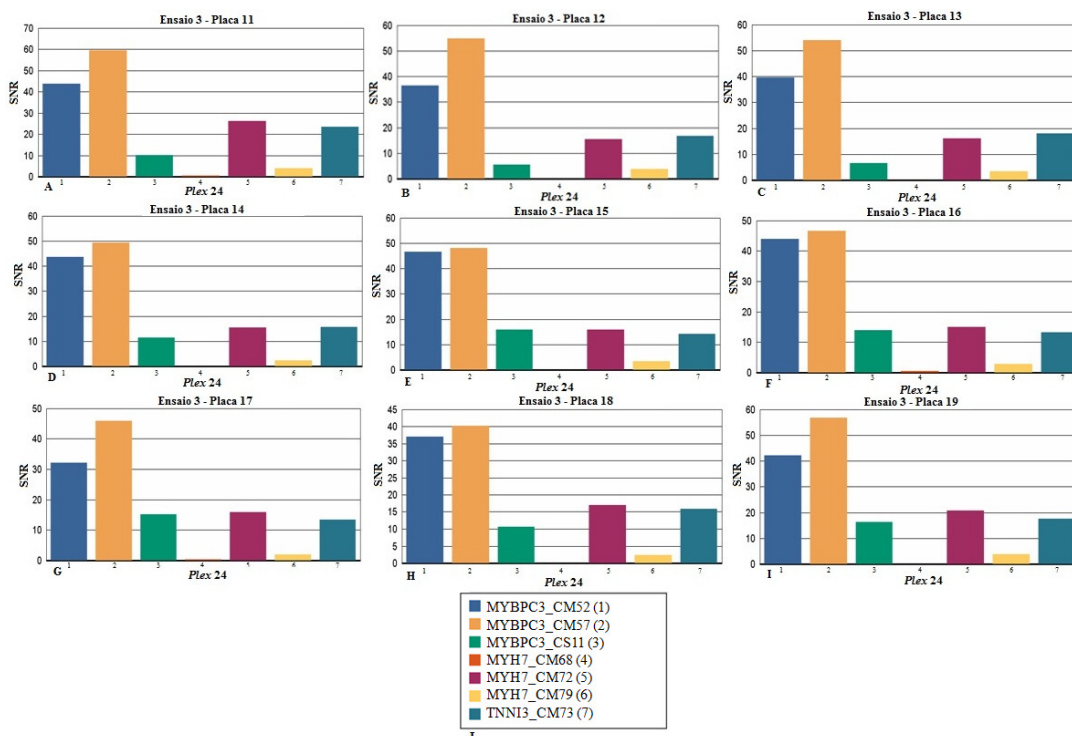


Figura 8.47 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 24 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 5 mutações analisadas neste *plex 24*. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 48



Anexo 49

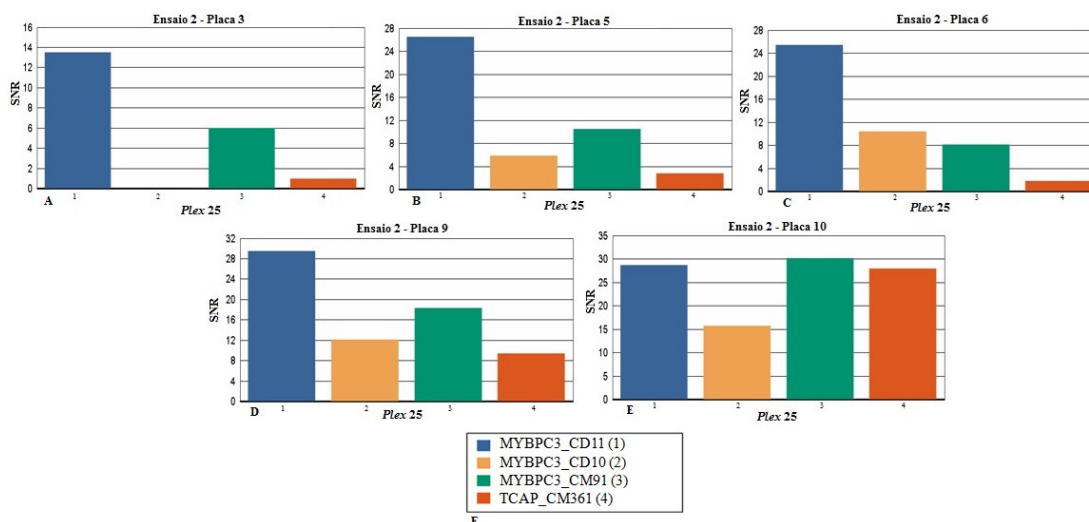
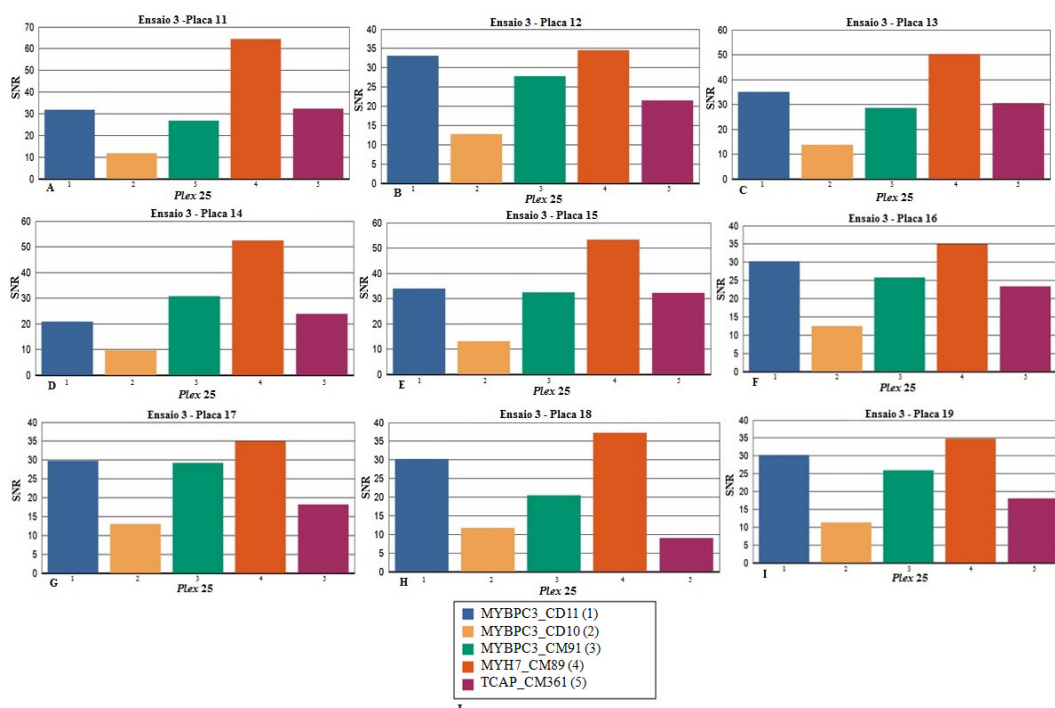


Figura 8.49 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 25 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 4 mutações analisadas neste plex 25. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 50



Anexo 51

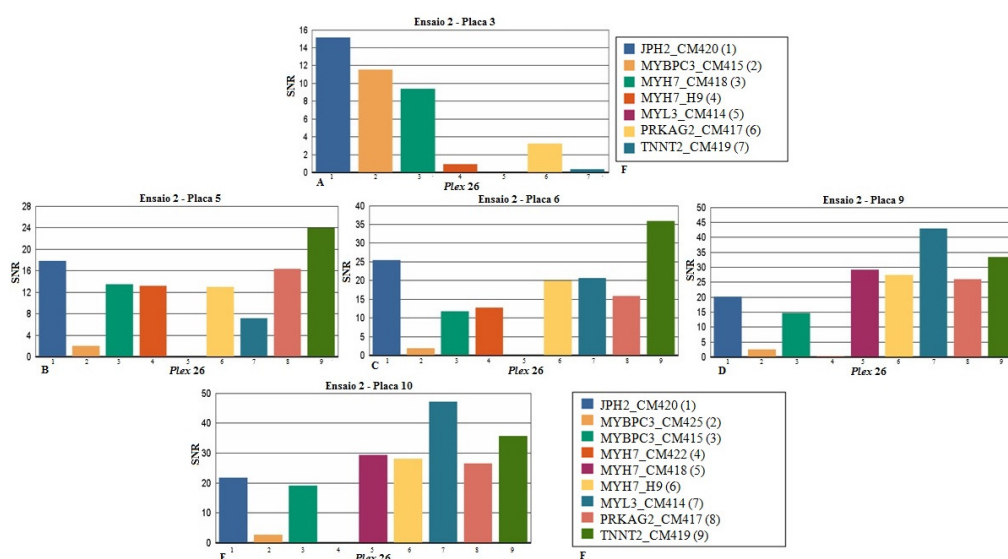


Figura 8.51 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 26 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 7 (A) e 9 (B, C, D e E) mutações analisadas neste plex 26. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 52

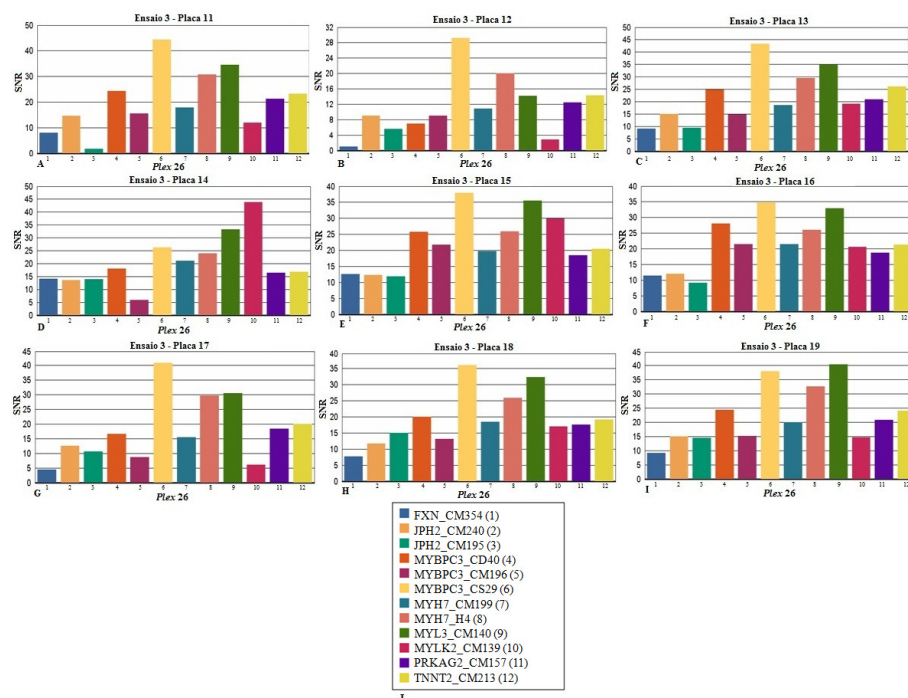


Figura 8.52 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 26 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 12 mutações analisadas neste plex 26. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 53

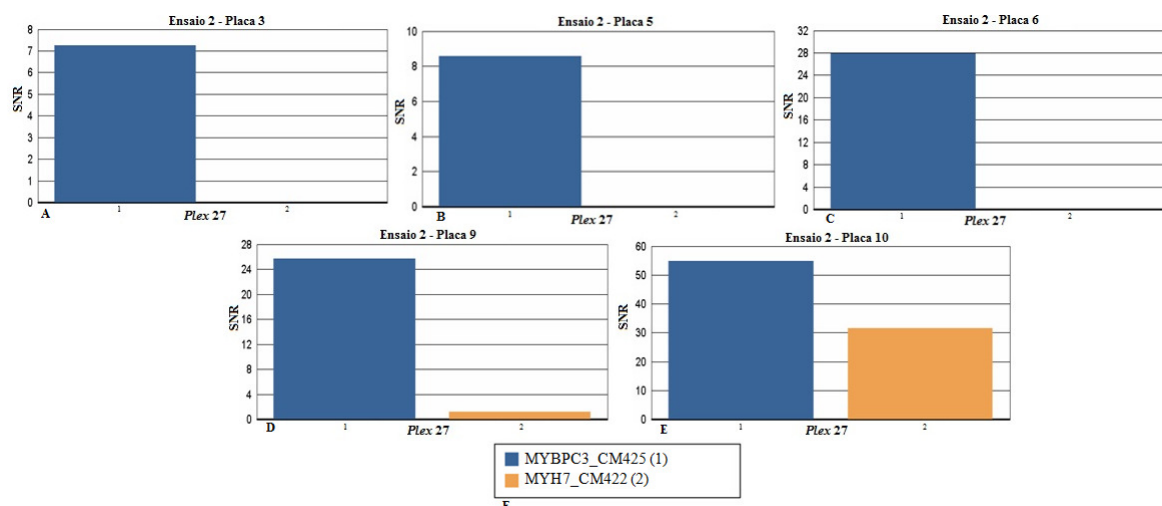
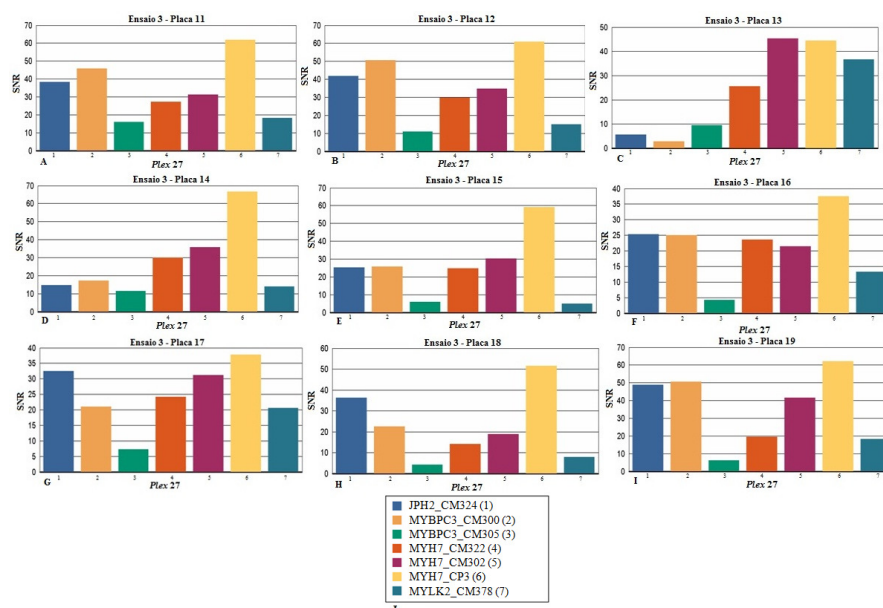
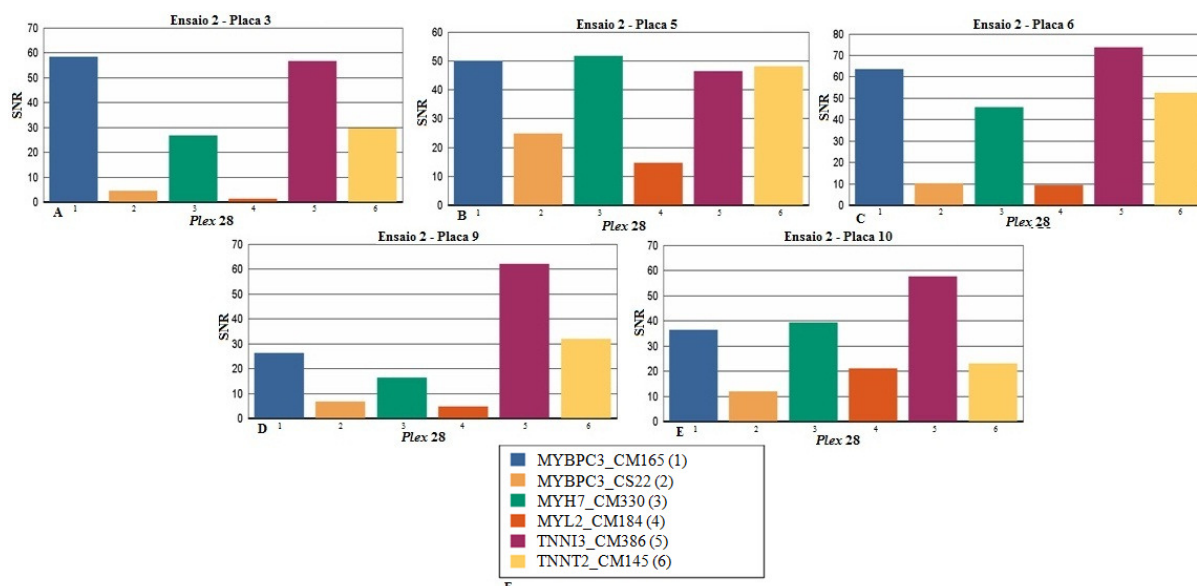


Figura 8.53 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 27 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 2 mutações analisadas neste plex 27. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 54



Anexo 55



Anexo 56

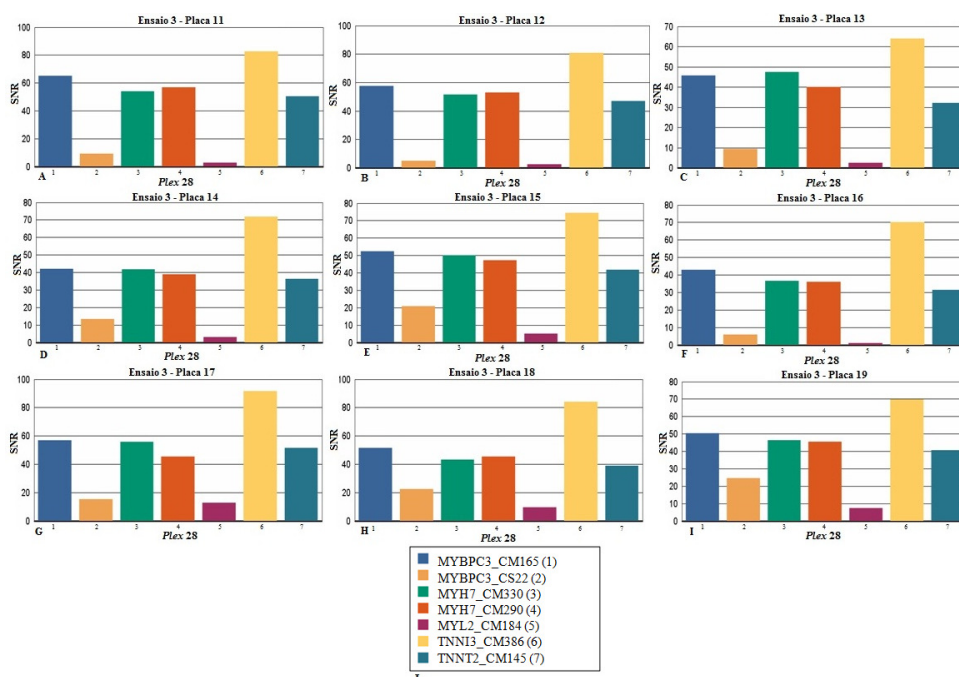


Figura 8.56 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 28 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 7 mutações analisadas neste plex 28. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 57

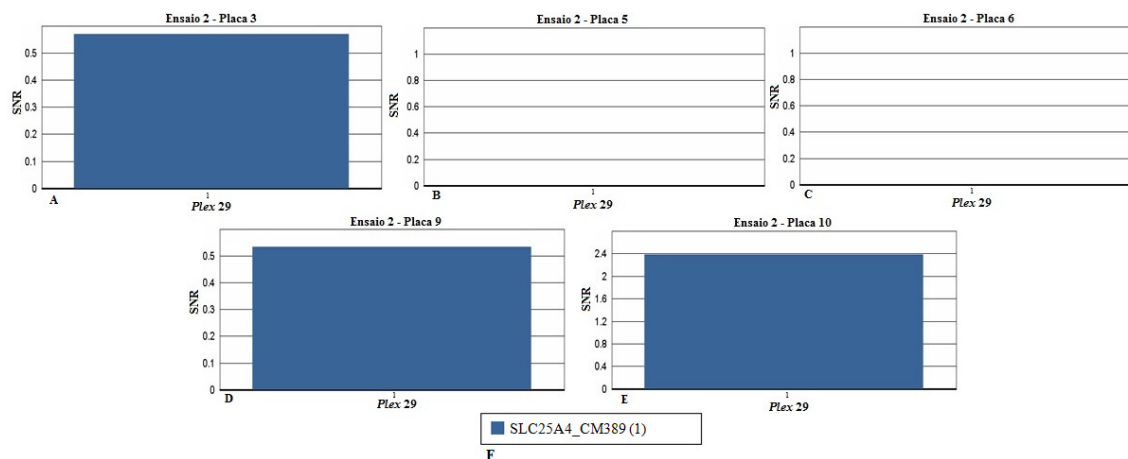


Figura 8.57 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 29 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas a mutação analisada neste plex 29. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 58

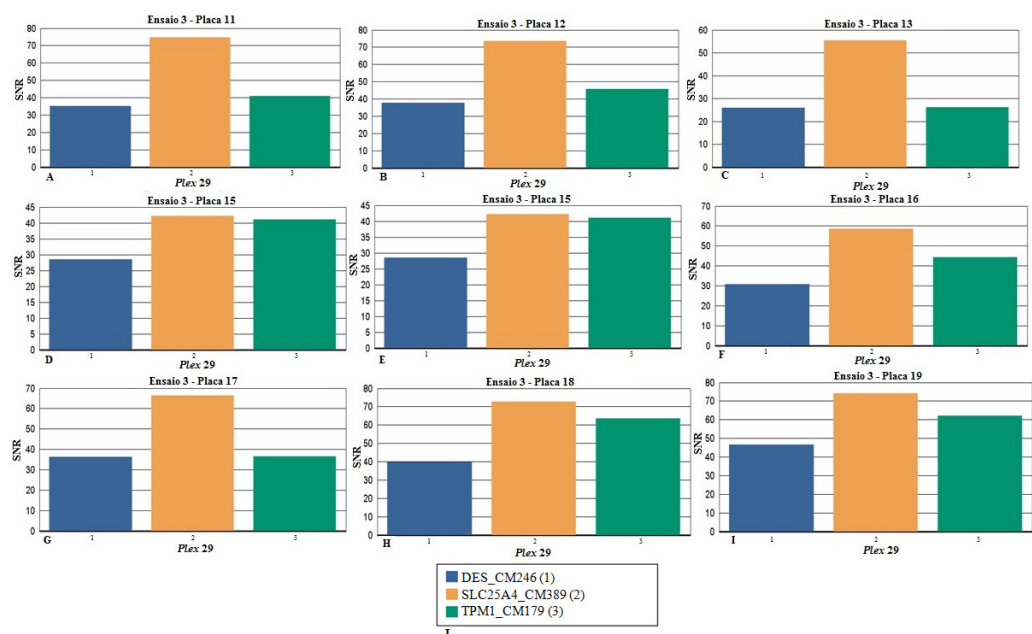


Figura 8.58 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 29 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 3 mutações analisadas neste *plex 29*. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 59

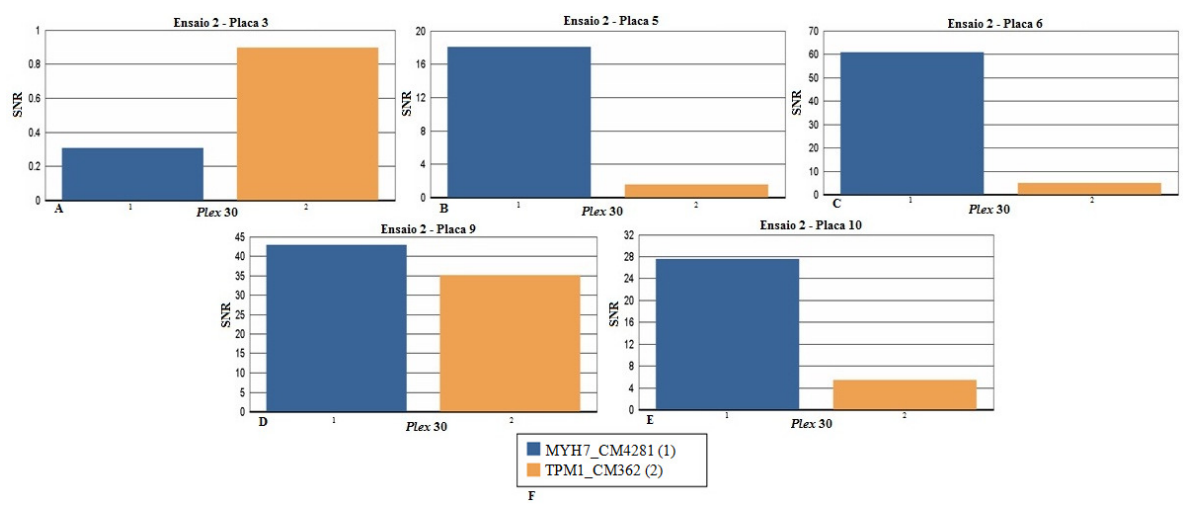


Figura 8.59 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 30 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 2 mutações analisadas neste *plex 30*. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 60

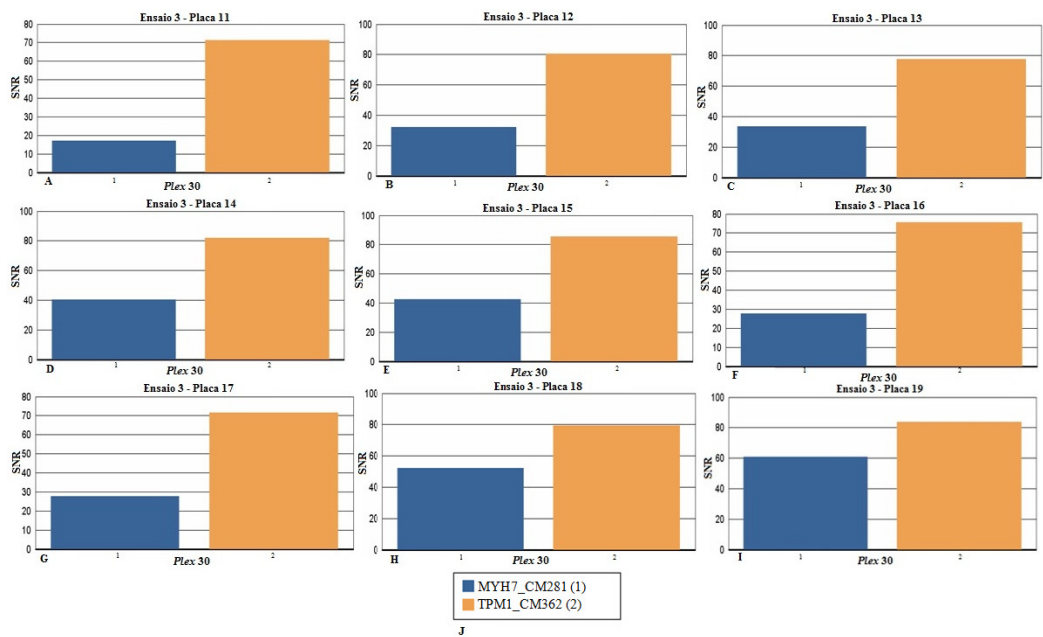


Figura 8.60 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 30 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 2 mutações analisadas neste plex 30. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 61

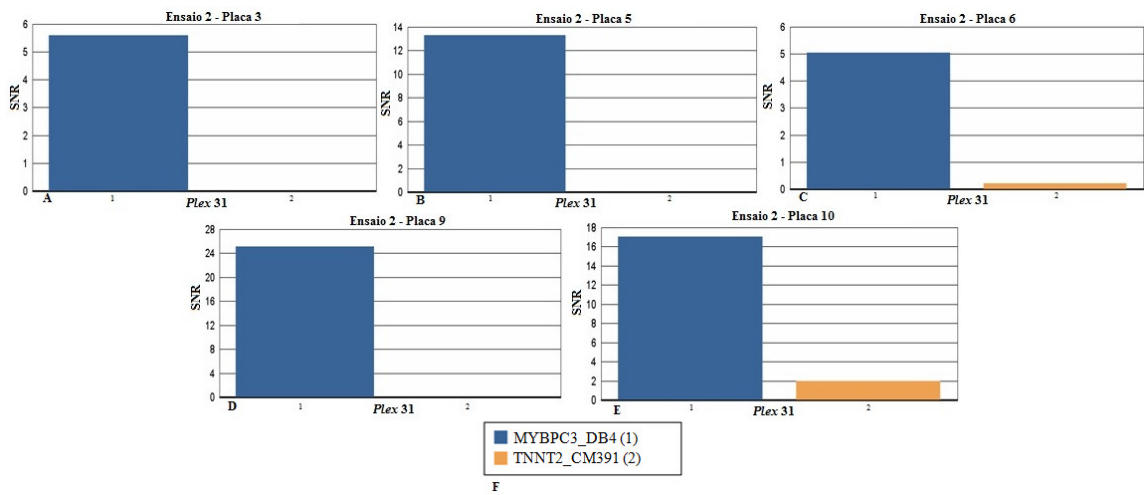


Figura 8.61 – Figura A-E - Primer Adjustment Report para o plex 31 no Ensaio 2. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 2 mutações analisadas neste plex 31. Na Figura F encontra-se a legenda da figura A-E, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-E.

Anexo 62

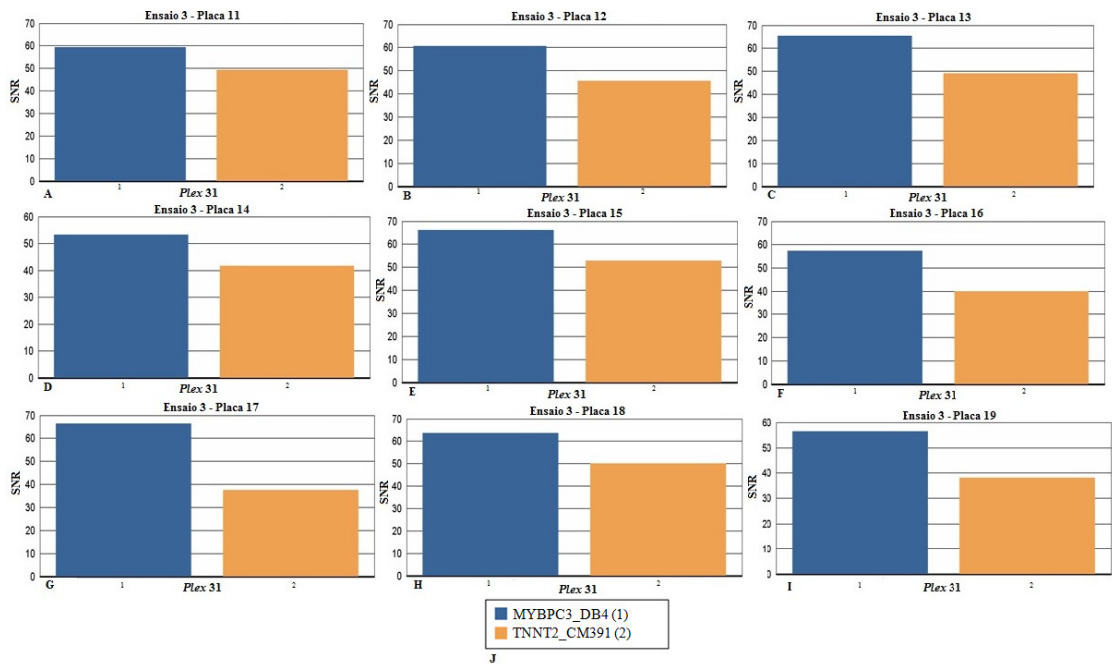


Figura 8.62 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 31 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 2 mutações analisadas neste *plex* 31. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 63

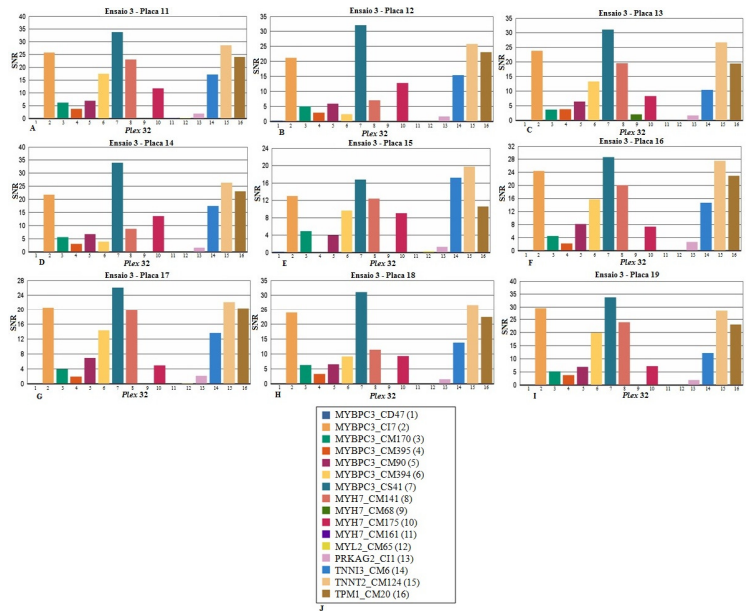


Figura 8.63 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 32 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 16 mutações analisadas neste *plex* 32. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 64

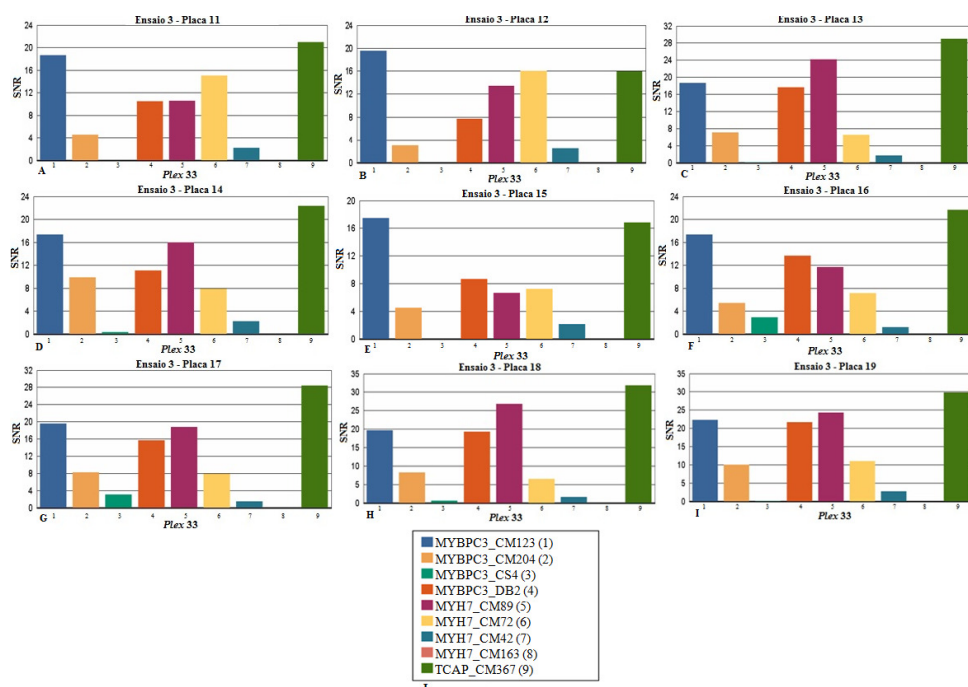


Figura 8.64 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 33 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 9 mutações analisadas neste plex 33. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 65

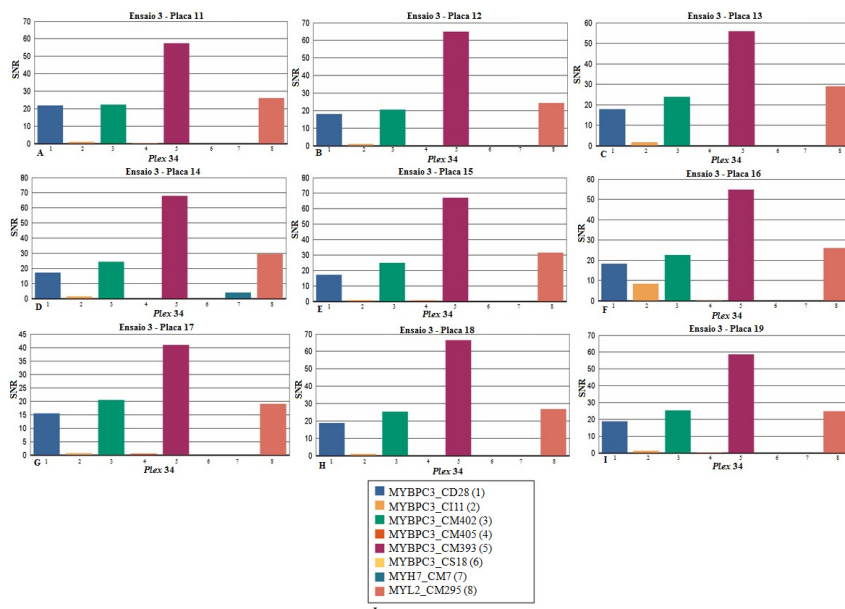


Figura 8.65 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 34 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 8 mutações analisadas neste plex 34. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.

Anexo 66

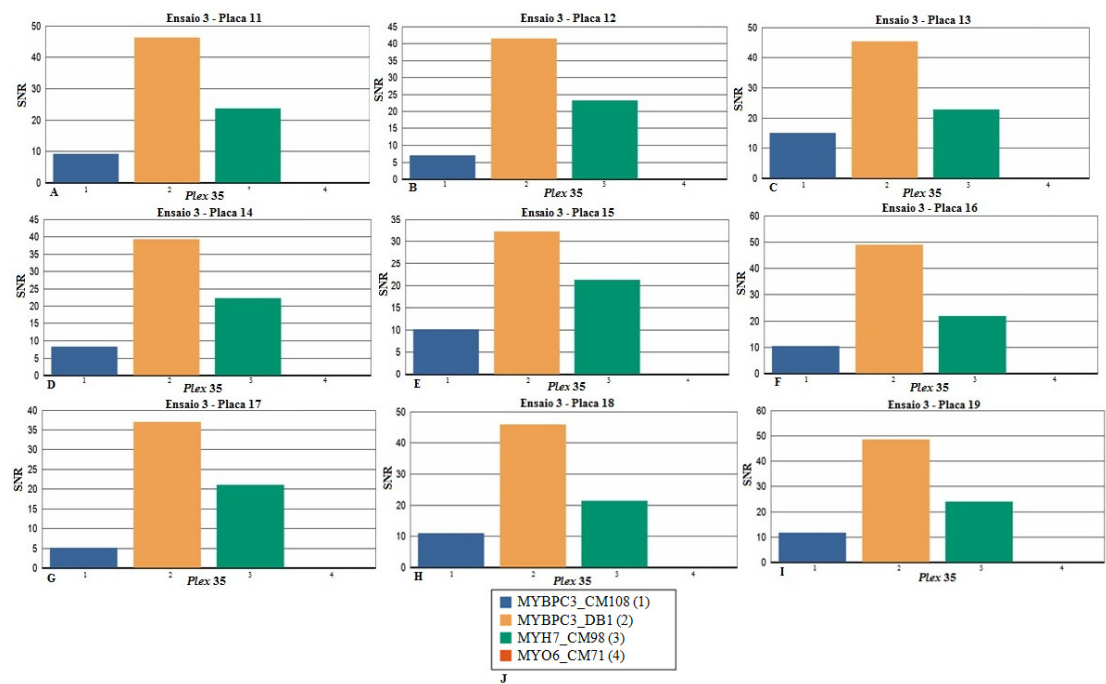


Figura 8.65 – Figura A-I - Primer Adjustment Report para o plex 35 no Ensaio 3. No eixo das abcissas encontram-se os valores de SNR e no eixo das ordenadas as 4 mutações analisadas neste *plex 35*. Na Figura J encontra-se a legenda da figura A-I, identificando-se as mutações/genes correspondentes a cada barra da figura A-I.